
DISEÑO Y DESARROLLO DE NUEVOS SISTEMAS BINARIOS
SÓLIDOS DE INGREDIENTES FARMACÉUTICOS ACTIVOS.
OPTIMIZACIÓN DE SU ACTIVIDAD TERAPÉUTICA.

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Farm. Vanesa Beatriz Sterren

Directora de tesis: Prof. Dra. Marcela Raquel Longhi

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Ciencias Farmacéuticas

Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica

UNITEFA-CONICET

Córdoba, Argentina

Comisión evaluadora de tesis

Dra. Elba I. Buján

Dr. Raúl E. Carbonio

Dra. Ariana Zoppi

Dr. Rubén M. Maggio

*“En este lugar no perdemos demasiado tiempo mirando hacia atrás.
Camina hacia el futuro, abriendo nuevas puertas y probando cosas nuevas.
Sé curioso...Porque nuestra curiosidad siempre nos conduce por nuevos caminos”*

Walt Disney

*A la niña que fui...
que quería ser detective y escritora*



ÍNDICE

<i>RESUMEN</i>	1
<i>ABSTRACT</i>	3
<i>ABREVIATURAS</i>	5
<i>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN</i>	7
<i>ANTECEDENTES.....</i>	9
<i>OBJETIVOS.....</i>	13
<i>OBTENCIÓN DE LOS SISTEMAS BINARIOS.....</i>	15
<i>CARACTERIZACIÓN DE SÓLIDOS FARMACÉUTICOS.....</i>	17
<i>CAPÍTULO II: CLORANFENICOL.....</i>	19
<i>INTRODUCCIÓN.....</i>	21
<i>OBTENCIÓN DE LAS COMBINACIONES CLR:AA.....</i>	23
<i>CONSIDERACIONES Y DESARROLLO EXPERIMENTAL</i>	23
<i>CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA</i>	27
<i>ESPECTROSCOPÍA DE INFRAROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (IRTF)</i>	27
<i>DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVOS (DRXP).....</i>	31
<i>ANÁLISIS TÉRMICO.....</i>	35
<i>ÁNGULO DE CONTACTO.....</i>	39
<i>MICROSCOPÍA DE BARRIDO ELECTRÓNICO (SEM).....</i>	43
<i>RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ESTADO SÓLIDO (RMNs)</i>	47
<i>ESTUDIOS DE DISOLUCIÓN.....</i>	51
<i>ENSAYO DE ACTIVIDAD MICROBIOLÓGICA.....</i>	55
<i>ANÁLISIS DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)</i>	57
<i>ESTUDIOS DE ESTABILIDAD</i>	61

CONCLUSIONES.....	67
CAPÍTULO III: GLIBENCLAMIDA.....	69
INTRODUCCIÓN	71
OBTENCIÓN DE LAS COMBINACIONES GLB:AA	73
CONSIDERACIONES Y DESARROLLO EXPERIMENTAL	73
CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA.....	75
ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (IRTF)	75
DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVOS (DRXP)	77
ANÁLISIS TÉRMICO.....	79
ÁNGULO DE CONTACTO.....	81
MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRÓNICO (SEM)	83
RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ESTADO SÓLIDO (RMNs).....	87
ENSAYO DE DISOLUCIÓN	91
ENSAYO DE ESTABILIDAD.....	95
CONCLUSIONES.....	101
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES FINALES.....	103
MATERIAL COMPLEMENTARIO	109
BIBLIOGRAFÍA	119
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	133
AGRADECIMIENTOS.....	135

RESUMEN

Se planteó como objetivo del presente trabajo de tesis la producción de nuevos sistemas binarios sólidos de cloranfenicol y glibenclamida mediante la combinación con aminoácidos, a fin de optimizar las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de estos principios activos. El análisis fisicoquímico se realizó mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier, difracción de rayos X de polvos, resonancia magnética nuclear de estado sólido, análisis térmico, microscopía de barrido electrónico y medición del ángulo de contacto. Además, se evaluó el comportamiento de disolución, la estabilidad y, en el caso de cloranfenicol, la actividad antimicrobiana y generación de especies reactivas de oxígeno.

Cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro utilizado para el tratamiento de infecciones oftálmicas debido a que su administración por vía oral se ha relacionado con problemas de toxicidad. Este principio activo se ha combinado con arginina, cisteína, glicina y leucina mediante liofilización. El comportamiento de disolución ha sido mejorado en todos los sistemas binarios debido a la reducción en el tamaño de partícula y cambio de hábito cristalino, factores que permitieron un incremento en la superficie expuesta del sólido. Por otro lado, la actividad microbiológica permaneció constante luego de obtenidas las combinaciones y el estrés oxidativo se redujo significativamente, ofreciendo así una nueva perspectiva en el uso de este antibiótico.

En el caso de glibenclamida, un fármaco hipoglucemiante utilizado por vía oral que presenta una pobre solubilidad acuosa, se ha combinado con arginina y serina mediante molienda asistida con solvente. Ambos sistemas han permitido mejorar el perfil de disolución del fármaco y demostraron ser estables en el tiempo. En la combinación con serina la mejora ha sido asociada a la reducción en el tamaño de partícula. Por otro lado, en el sistema sólido obtenido con arginina, además de la reducción del tamaño, se logró mejorar el grado de humectación del sólido y se demostró la existencia de interacciones entre los componentes, factores que en diferente medida contribuyeron al aumento en la velocidad de disolución del fármaco.

ABSTRACT

The objective of this thesis has been the production of new solid binary systems of chloramphenicol and glibenclamide through their combination with amino acids, with the purpose of optimizing the physicochemical and biopharmaceutical properties of these drugs. The physicochemical analysis were performed by Fourier-transform infrared spectroscopy, X-ray powder diffraction, solid-state nuclear magnetic resonance, thermal analysis, scanning electron microscopy studies and contact angle measurements. In addition, dissolution performance, stability and, in the chloramphenicol case, antimicrobial activity and generation of reactive oxygen species were evaluated.

Chloramphenicol is a broad spectrum antibiotic used in treatments of ophthalmic infections because its oral administration has been related to toxicity problems. It has been combined with arginine, cysteine, glycine, and leucine by lyophilization. The dissolution behavior has been improved in all the solid combinations due to the reduction of the particle size and change of habit crystal, factors that allowed an increase in the exposed surface of the solid. On the other hand, microbiological activity remained constant after combinations were obtained and oxidative stress was significantly reduced, offering a new perspective on the use of this antibiotic.

In the glibenclamide case, a hypoglycemic drug used orally that has poor aqueous solubility, has been combined with arginine and serine by solvent-assisted grinding. Both combinations had allowed to improve the dissolution profile of the drug and proved to be stable over time. In the serine combination, the increment has been associated with the reduction in the particle size. Besides, in the solid system obtained with arginine, in addition to the reduction in the particle size, the degree of wetting of the solid has been improved and the existence of an interaction between the components was demonstrated. These factors contributed to the increase in the speed of dissolution of glibenclamide in a different degree.

ABREVIATURAS

AA	Aminoácido
AC	Ángulo de contacto
ARG	Arginina
CAT	Catalasa
CIS	Cisteína
CLR	Cloranfenicol
CLR:AA LIO	Combinación CLR:AA obtenida mediante liofilización
CLR:AA MF	Combinación CLR:AA obtenida mediante mezcla física
DE	Desviación estándar
DHR-123	Dihidrorodamina-123
DRXP	Difractometría de rayos X de polvos
DSC	Calorimetría diferencial de barrido/Differential Scanning Calorimetry
ERO	Especies reactivas de oxígeno
f_1	Factor de diferencia
f_2	Factor de similitud
FA	Farmacopea Argentina
FDA	Administración de alimentos y medicamentos/ Food and Drug Administration
GLB	Glibenclamida
GLB:AA MAS	Combinación GLB:AA obtenida mediante molienda asistida con solvente
GLB:AA MF	Combinación GLB:AA obtenida mediante mezcla física
GLI	Glicina
GPx	Glutación peroxidasa
GRAS	Generalmente reconocidos como seguros/ Generally Recognized as Safe

HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia/ High performance liquid chromatography
HR	Humedad relativa
IFA	Ingrediente farmacéutico activo
IRTF	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier
LEU	Leucina
LIO	Liofilizado
logP	Constante de lipofilicidad
MAS	Molienda asistida por solvente
MF	Mezcla física
pKa	Constante de disociación ácida
RMNs	Resonancia magnética nuclear de estado sólido
RPM	Rotaciones por minuto
SCB	Sistema de clasificación biofarmacéutica
SEM	Microscopía de barrido electrónico/Scanning Electron Microscope
SOD	Superóxido dismutasa
t_0	Tiempo cero
t_1	Tiempo: un mes
t_{12}	Tiempo: doce meses
t_2	Tiempo: dos meses
t_3	Tiempo: tres meses
t_6	Tiempo: seis meses
TG	Termogravimetría
t_r	Tiempo de retención

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

Con el paso del tiempo el ser humano ha desarrollado mecanismos de defensa y supervivencia ante las adversidades que han permitido incrementar la expectativa de vida. Como dijo la Dra. Margaret Chan (Directora general de la Organización Mundial de la Salud 2007-2017) *“El mundo ha avanzado a grandes pasos en la reducción del sufrimiento innecesario y las muertes prematuras a causa de enfermedades que pueden prevenirse y tratarse”*. El desarrollo de medicamentos es un claro ejemplo de las herramientas que han hecho esto posible al disminuir la mortalidad y mejorar la calidad de vida de la población¹. Se puede mencionar la aparición de los antibióticos en la primera mitad del siglo XX, que junto a las vacunas han logrado reducir las muertes asociadas a enfermedades infecciosas².

La Farmacopea Argentina³ define como medicamento a todo producto farmacéutico empleado para la prevención, diagnóstico o tratamiento de una enfermedad, o para modificar sistemas fisiológicos en beneficio de la persona a quien se le administra. Es posible distinguir dos clases de componentes principales en un medicamento: los ingredientes farmacéuticos activos (IFA), también llamados principios activos o fármacos, responsables de su actividad terapéutica, y los excipientes, todas aquellas sustancias añadidas a una formulación sin propósito terapéutico.

Existen diferentes formas en las que un principio activo puede ser administrado para un tratamiento conveniente y eficaz. La vía de administración oral constituye la alternativa de elección por médicos y pacientes debido a los menores riesgos que implica con respecto a vías parenterales, la autonomía, practicidad y gran versatilidad que presenta⁴.

La forma farmacéutica seleccionada dependerá de la naturaleza de la enfermedad, la manera en la que deba tratarse (local o sistémica) y las condiciones propias del paciente. La formulación de principios activos en formas farmacéuticas sólidas resulta ventajosa debido a que se adapta a la mayoría de los pacientes y a la mayor estabilidad que presentan los IFA formulados de esta manera con respecto a los contenidos en formas farmacéuticas líquidas. De hecho, se estima que el 70% de las formas farmacéuticas dispensadas en la actualidad corresponden a comprimidos y cápsulas⁵. Sin embargo,

debe considerarse que la biodisponibilidad de un principio activo administrado por vía oral puede ser irregular e incompleta en el caso de IFA poco solubles, de absorción lenta, inestables o que son metabolizados extensamente⁴.

Aproximadamente el 40% de los principios activos disponibles en el mercado y más del 75% de los compuestos en vía de desarrollo presentan una pobre solubilidad acuosa⁶, con la consiguiente deficiencia en la biodisponibilidad que esto puede significar. Otro de los inconvenientes de los tratamientos actuales es la creciente resistencia antimicrobiana, que ha llevado a que ciertos antibióticos, que por ejemplo habían caído en desuso por problemas de toxicidad, sean considerados nuevamente como alternativas terapéuticas.

Las dificultades mencionadas, sumado al hecho de que el desarrollo de nuevos fármacos es un proceso arduo y costoso, convierten a la optimización de los IFA actualmente disponibles en el mercado en una alternativa viable para superar los inconvenientes que presentan los tratamientos farmacoterapéuticos actuales. Algunas de las estrategias que pueden mencionarse son la disminución del tamaño de partículas^{7,8}, formación de sales^{9,10}, complejos de inclusión^{11,12}, sistemas basados en lípidos^{13,14}, obtención de polimorfos^{15,16}, cocristales^{17,18}, dispersiones sólidas amorfas^{19,20} y sistemas coamorfos^{21,22}.

El creciente interés por el estudio del estado sólido reside en que la mayoría de los principios activos disponibles se presentan en forma sólida y, como se ha mencionado con anterioridad, gran parte de los medicamentos que se dispensan en la actualidad corresponden a formas farmacéuticas sólidas. Las propiedades fisicoquímicas, farmacotécnicas y biofarmacéuticas que presentan condicionan el desempeño del fármaco en el uso clínico, conocer sus propiedades, comportamiento y estabilidad resulta fundamental para una formulación y utilización adecuada.

Una manera de mejorar la solubilidad y velocidad de disolución de un compuesto es mediante la reducción de las fuerzas intermoleculares en estado sólido, el aumento de la atracción entre soluto y solvente o el incremento del área expuesta del compuesto⁶. Es así como la velocidad de disolución se ve afectada por el tamaño de partícula, hábito cristalino, grado de humectación del sólido y la forma polimórfica existente.

Los sólidos farmacéuticos pueden ser cristalinos, caracterizados por un arreglo regular en la disposición de sus moléculas, o amorfos, que carecen de orden de largo

alcance en su estructura (Figura 1). Esto se traduce en diferentes propiedades físicas y químicas. Si bien los sólidos amorfos presentan algunas condiciones deseables para un principio activo, por ejemplo una mayor tasa de disolución, la mayoría de los IFA se formulan y comercializan en forma cristalina, debido a la menor estabilidad del estado amorfo y su innata tendencia a cristalizar¹⁵.

Asimismo, se conoce que los cristales (uni y multicomponentes) pueden existir en distintas formas o polimorfos. Este fenómeno se caracteriza por diferencias en el arreglo interno de las moléculas en la estructura cristalina, lo que puede afectar propiedades fisicoquímicas de los compuestos y a su vez condicionar la estabilidad y biodisponibilidad de un principio activo¹⁶.

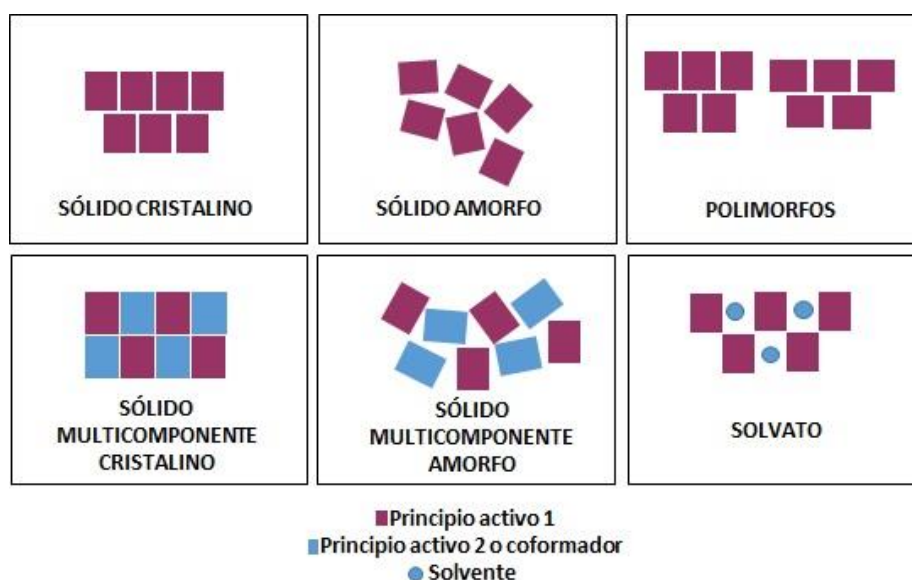


Figura 1. Esquema de diferentes formas sólidas en las que puede presentarse un principio activo

A diferencia del estado polimórfico de un principio activo, que es el reflejo de su estructura interna, la estructura externa de un cristal, hábito cristalino o morfología²³ se caracteriza por las dimensiones de las partículas (largo, ancho, espesor), apariencia de la superficie (rugosidad, suavidad, porosidad), distribución del tamaño y estado de aglomeración que presenta²⁴.

Esta característica juega un rol clave en el comportamiento de los polvos y propiedades fisicoquímicas de un principio activo como humectabilidad, resistencia mecánica, fluidez y densidad así como en la facilidad de procesamiento²⁵. En el caso de productos farmacéuticos en estado sólido, la morfología del cristal determina la tasa de

disolución y por lo tanto afecta la biodisponibilidad de los IFA²⁶. La modificación del hábito cristalino de un fármaco sin afectar el estado polimórfico constituye una alternativa atractiva para mejorar las propiedades de disolución de un principio activo sin afectar su estabilidad física.

El tamaño y número de caras de un cristal expuestas al solvente determinarán la velocidad de disolución, es por eso que se puede predecir que determinados hábitos cristalinos favorecen la disolución de un compuesto más que otros, por ejemplo, las formas aciculares o ahuecadas en el interior que aumentan la superficie del sólido²⁷. Este mismo efecto puede observarse al reducir el tamaño de partícula del fármaco debido a que al aumentar la superficie expuesta la disolución puede ser más rápida.

OBJETIVOS

A partir de lo detallado anteriormente se ha planteado como objetivo del presente trabajo de tesis la producción de nuevos sistemas binarios sólidos de IFA que permitan optimizar sus propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas. Los objetivos específicos se detallan a continuación:

- Obtención de nuevos sistemas binarios sólidos de glibenclamida (GLB) y cloranfenicol (CLR) a partir de su combinación con aminoácidos (AA).
- Caracterización fisicoquímica de las combinaciones obtenidas.
- Evaluación de la velocidad de disolución.
- Evaluación de la actividad microbiológica y estrés oxidativo en el caso de CLR.
- Evaluación de la estabilidad física y química.

Para llevar a cabo estos objetivos se desarrollaron las siguientes actividades:

- Evaluación de diferentes metodologías de obtención de sistemas sólidos, siendo de elección aquellas que respondan a los principios establecidos por la química verde o sostenible.
- Análisis de las propiedades fisicoquímicas de las combinaciones mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (IRTF), difracción de rayos X de polvos (DRXP), resonancia magnética nuclear de estado sólido (RMNs), calorimetría diferencial de barrido (por su sigla en inglés DSC), análisis termogravimétrico (TG), microscopía de barrido electrónico (por su sigla en inglés SEM) y medición de ángulo de contacto (AC).
- Evaluación del comportamiento de disolución de los fármacos a partir de las nuevas combinaciones y comparación de los perfiles obtenidos con respecto al fármaco sin procesar.
- En el caso de CLR, evaluación de la actividad microbiológica y de la generación de especies reactivas de oxígeno.
- Análisis de la estabilidad física (mediante SEM, DRXP, RMNs y análisis térmico) y química (mediante HPLC y estudio de la actividad antimicrobiana).

OBTENCIÓN DE LOS SISTEMAS BINARIOS

La tendencia de la sociedad actual por reducir el impacto ambiental y utilizar prácticas sustentables y seguras representa un desafío en las ciencias farmacéuticas a la hora de desarrollar productos de calidad mediante técnicas que respondan a esta necesidad. Durante el diseño de procesos, la química verde o sostenible promueve la observación de las siguientes consideraciones:

- minimización de los recursos utilizados,
- impacto de los materiales sobre el medioambiente y la salud (toxicidad, degradación),
- viabilidad económica de los procesos,
- naturaleza y cantidad de los desechos generados²⁸.

El uso de vías alternativas para la síntesis de compuestos es una de las herramientas de la industria para reducir la emisión de contaminantes al ambiente. Algunas de estas estrategias se basan en procesos mecanoquímicos, síntesis fotoquímicas y biomiméticas, así como en el uso de materias primas inocuas y renovables, solventes seguros para la salud y el ambiente y catalizadores que se puedan recuperar con facilidad²⁹. En particular en este proyecto de tesis se recurrieron a técnicas mecanoquímicas y secado por liofilización para la obtención de los sistemas sólidos, métodos que serán descriptos en los próximos capítulos con mayor profundidad.

Los IFA estudiados se combinaron con aminoácidos con el objetivo de mejorar sus propiedades. Los aminoácidos y sus derivados pueden encontrarse en una amplia variedad de compuestos terapéuticos así como en productos de la vida diaria³⁰. Resultan atractivos para ser utilizados como coformadores en la obtención de sistemas sólidos debido a que son de bajo costo, algunos de ellos pertenecen a la lista GRAS (Del inglés *Generally Recognized as Safe*, Generalmente reconocidos como seguros) que establece la FDA (Del inglés *Food and Drug Administration*, USA) y han demostrado ventajas en la optimización de IFA, ya sea al estabilizar compuestos amorfos³¹, en la obtención de sales y cocristales³⁰ o en la incorporación en sistemas ternarios con ciclodextrinas³².

CARACTERIZACIÓN DE SÓLIDOS FARMACÉUTICOS

Las diferentes formas sólidas que puede presentar un principio activo pueden tener propiedades fisicoquímicas distintas. Si esta propiedad afecta la solubilidad o velocidad de disolución, puede que la biodisponibilidad del fármaco se vea afectada, sobre todo si se trata de IFA que pertenecen a la clase II (baja solubilidad, alta permeabilidad) del sistema de clasificación biofarmacéutica (SCB). También las propiedades mecánicas y estabilidad de un principio activo se pueden ver modificadas ante la existencia de diferentes formas sólidas³³. De aquí se desprende la importancia de una caracterización adecuada de los sólidos farmacéuticos.

El estudio del estado sólido puede ser abordado en diferentes niveles. En primer lugar, desde un punto de vista molecular o supramolecular donde se considera la organización de las moléculas en el estado sólido. El análisis a este nivel se efectúa mediante técnicas espectroscópicas, térmicas, cristalográficas y microscópicas³⁴.

En segundo lugar, es posible mencionar el análisis a nivel particulado, que incluye propiedades como hábito cristalino, dimensiones de las partículas y área superficial, que tienen efecto sobre la disolución, reología y compactación. La microscopía es una de las técnicas que permiten realizar un análisis interesante a este nivel.

Por último, las propiedades observadas a nivel multiparticulado, llamado también a granel, tienen gran inferencia sobre el desarrollo de productos farmacéuticos en procesos farmacotécnicos³⁴. En el presente trabajo de tesis la atención ha sido centrada en los dos primeros niveles de estudio.

Sumado a la caracterización fisicoquímica de los sistemas sólidos (Figura 2), cuyas técnicas serán descriptas oportunamente en los próximos capítulos, se efectuaron estudios de disolución, estrés oxidativo, microbiológicos y estabilidad.

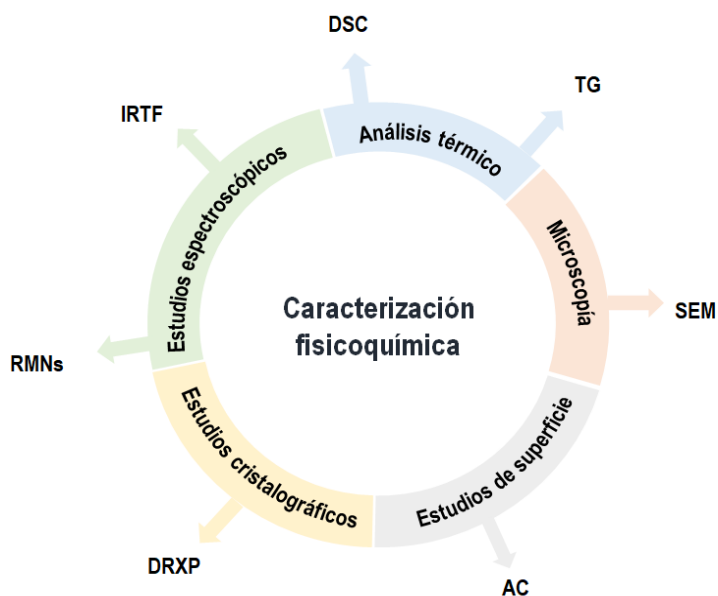


Figura 2. Esquema de las técnicas utilizadas para la caracterización de los sistemas sólidos.

Los estudios de disolución son de gran utilidad para comparar el desempeño de un nuevo sólido con el del fármaco sin procesar. Estos ensayos en la práctica diaria se utilizan como control de calidad de las formulaciones sólidas de administración oral, para evaluar la consistencia lote a lote y también en ensayos de bioequivalencia. En este trabajo se realizaron con el objetivo de evaluar el desempeño de las combinaciones IFA:AA.

En el caso de CLR se realizaron estudios microbiológicos con la intención de corroborar que la actividad del fármaco se conserve durante la obtención de las combinaciones CLR:AA. Además, se evaluó la producción de especies reactivas de oxígeno debido a que es uno de los mecanismos que explica la toxicidad de CLR y que han limitado su uso.

Finalmente, para ambos fármacos se realizaron estudios de estabilidad. Se trata de uno de los principales atributos de calidad a los que debe responder un IFA, considerando que muchas veces las materias primas y productos farmacéuticos deben ser almacenados por tiempo prolongado y los compuestos deben mantener las propiedades físicas y químicas originales. CLR y GLB son fármacos estables en condiciones normales^{35,36}, sin embargo, ante la obtención de nuevos sistemas sólidos con aminoácidos, debe asegurarse que la estabilidad no se vea comprometida.

CAPÍTULO II

CLORANFENICOL

INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana representa un serio problema de salud a nivel mundial. Consiste en un fenómeno natural de los microorganismos que se ve acelerado por el uso indebido de agentes antimicrobianos en humanos y animales³⁷. La falta de nuevos principios activos efectivos conduce a la promoción del uso racional de antibióticos y a que las investigaciones se orienten a la optimización de los antimicrobianos disponibles.

Cloranfenicol (pKa: 5,50; logP: 1,14) es un antibiótico de amplio espectro que inhibe la síntesis de proteínas por unión a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano³⁸. Su administración sistémica se vio restringida debido a problemas de toxicidad relacionados a la producción de estrés oxidativo³⁹. La utilización de este fármaco se ha vinculado con el desarrollo de anemia aplásica y supresión de médula ósea⁴⁰; por estos motivos el uso se ha limitado principalmente a tratamientos tópicos para infecciones oftálmicas⁴¹.

Sin embargo, en la actualidad se considera un antibiótico con gran potencial para el tratamiento de patógenos multi-resistentes³⁸, razón por la que diversas áreas de investigación dirigen sus esfuerzos hacia el estudio de los mecanismos de toxicidad, así como al desarrollo de estrategias que permitan mejorar el desempeño de este antibiótico en el uso clínico.

CLR es producido por especies del género bacteriano *Streptomyces*, no obstante debido a la simplicidad de su molécula (Figura 3) en la actualidad es obtenido por síntesis química, de hecho fue el primer antibiótico desarrollado para producción a gran escala⁴⁰.

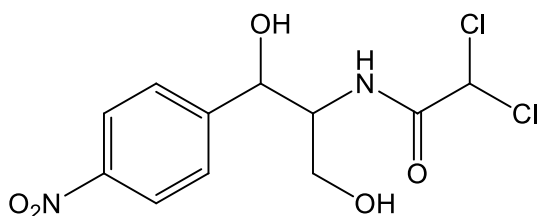


Figura 3. Estructura química de CLR

En su estructura se puede observar un grupo nitrobencono unido a un propanol, así como un grupo amino conectado a un derivado de ácido dicloroacético. Para una buena actividad antimicrobiana los grupos propanol y dicloroacético deben permanecer intactos⁴².

Debido a que CLR posee una escasa solubilidad acuosa^{43,44} se han utilizado diferentes estrategias para superar este inconveniente, se pueden mencionar como ejemplos la obtención de sales⁴⁵ y la amorfización del compuesto⁴⁶. Además, se ha demostrado que el tamaño de partícula de CLR tienen efecto sobre los niveles sanguíneos alcanzados por el fármaco⁴⁷, razón por la cual es importante una caracterización adecuada del estado sólido de este compuesto.

OBTENCIÓN DE LAS COMBINACIONES CLR:AA

CONSIDERACIONES Y DESARROLLO EXPERIMENTAL

La liofilización (LIO) es un método que consiste en remover el agua de un material congelado mediante sublimación. En condiciones de alto vacío, el agua pasa de estado sólido a gaseoso sin fundirse, el vapor resultante se deposita sobre la superficie de un condensador a bajas temperaturas⁴⁸. Esta estrategia de secado tiene gran aplicación a nivel industrial y permite conservar las propiedades de los materiales debido a que no son expuestos a altas temperaturas para eliminar el agua del medio.

Este proceso resulta atractivo en las ciencias farmacéuticas debido a la facilidad de escalado y a que tiende a conservar la estabilidad de las muestras y sus propiedades originales. Algunos antecedentes en áreas de investigación y desarrollo han demostrado la factibilidad de esta técnica para la obtención de sistemas nanoparticulados^{49,50} y complejos de inclusión con oligosacáridos^{51,52}, por mencionar sólo alguna de las aplicaciones.

En la obtención de las nuevas formas sólidas de CLR se utilizaron aminoácidos que han demostrado tener propiedades antioxidantes. En trabajos previos del grupo de investigación se ha estudiado el efecto de cisteína (CIS) y glicina (GLI) sobre CLR en complejos de inclusión con β -ciclodextrina⁵³, debido a que los resultados fueron alentadores se han seleccionado como coformadores potenciales para la obtención de los sistemas binarios.

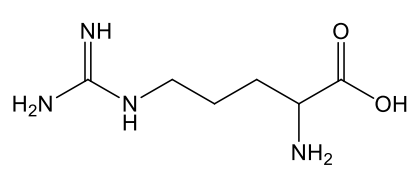
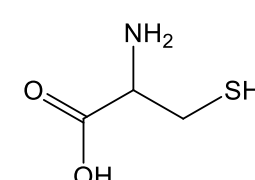
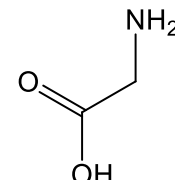
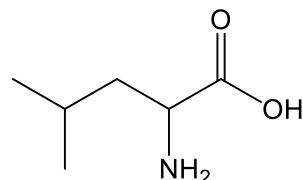
Estos aminoácidos son antioxidantes exógenos que actúan contra la lesión tisular oxidativa⁵⁴, efecto que puede estar relacionado directamente con los compuestos en sí mismos o por ser precursores en la producción de glutatión, principal antioxidante en las células que regula la homeostasis de radicales libres^{55,56}.

Por otro lado, se ha reportado que la disponibilidad de arginina (ARG), un aminoácido condicional, resulta crítica para suprimir el estrés oxidativo e inducir la respuesta antioxidante endógena al estimular la síntesis de glutatión⁵⁷. Además, existen investigaciones sobre este aminoácido y sus efectos positivos sobre la respuesta inmune y el metabolismo^{58,56}, por lo que resulta relevante evaluar el comportamiento de CLR en presencia de este aminoácido.

En cuanto a leucina (LEU), un aminoácido esencial, todavía no está claro si tiene inferencia sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno que provocan daño celular, sin embargo, hay antecedentes de que suplementos con LEU reducen la generación de estas especies en determinadas líneas celulares^{59,60}.

A continuación (Tabla 1) se pueden observar las estructuras químicas de los aminoácidos utilizados para la obtención de nuevos sistemas sólidos de CLR.

Tabla 1. Estructuras químicas de los AA utilizados para la obtención de sistemas sólidos CLR:AA

<p>ARGININA (ARG)</p>  <chem>NC(=[NH2+])NCCC[C@@H](N)C(=O)O</chem>	<p>CISTEÍNA (CIS)</p>  <chem>N[C@@H](CS)C(=O)O</chem>
<p>GLICINA (GLI)</p>  <chem>N[C@@H]C(=O)O</chem>	<p>LEUCINA (LEU)</p>  <chem>CC(C)[C@H](N)C(=O)O</chem>

Para la obtención de las combinaciones binarias (CLR:AA, donde AA es ARG, CIS, GLI o LEU) se prepararon soluciones equimolares de CLR con cada uno de los aminoácidos en agua MilliQ. Con el fin de favorecer la disolución de los componentes, las muestras se mantuvieron en un baño ultrasónico durante una hora. Luego de ser congeladas, fueron sometidas a liofilización para remover el agua del medio (Freeze Dryer 4.5, Labconco Corp., Kansas, Missouri). Una vez obtenido el polvo seco se recolectó y almacenó a temperatura ambiente bajo condiciones de vacío. Los rendimientos obtenidos mediante esta técnica superaron el 90% debido a que prácticamente no hay pérdidas de material a lo largo del proceso. Además, se prepararon las mezclas físicas de los componentes en una proporción 1:1 molar (CLR:AA MF) a través de un mezclado uniforme en un mortero de ágata.

La integridad macroscópica del polvo obtenido mediante liofilización es un factor importante a considerar; la muestra debe ser homogénea y no debe presentar aglomerados para asegurar el éxito del proceso de secado⁶¹. En este caso los polvos obtenidos resultaron de color y textura uniforme bajo la inspección visual, sin la aglomeración de material.

En cuanto a la procedencia de los componentes de partida utilizados para obtener las combinaciones se puede mencionar que CLR y GLI fueron adquiridos de Parafarm (Argentina), mientras que CIS, ARG y LEU a partir de Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA). El agua utilizada fue producida mediante un sistema de purificación de agua MilliQ (Millipore, USA).

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (IRTF)

Esta técnica se basa en la medición de la absorción de radiación infrarroja (IR) debido a vibraciones moleculares. Es posible distinguir vibraciones de estiramiento (cambios en la longitud de enlace) y de flexión (cambios en el ángulo de enlace)⁶². Los espectros de infrarrojo son tomados usualmente en una escala inversa a la longitud de onda, unidad conocida como número de onda (cm^{-1}), que resulta directamente proporcional a la energía⁶³.

La región IR se puede subdividir en tres zonas, no obstante se centrará la atención en el IR medio (4000 a 400 cm^{-1}) debido a que brinda mayor información estructural. El estudio se torna complejo de 1800 a 400 cm^{-1} , región de las huellas dactilares, donde la asignación de señales suele no estar bien definida, sin embargo por comparación con un espectro de referencia es posible identificar un compuesto⁶³.

Al analizar los espectros debe considerarse el número de onda y la intensidad de la banda para una caracterización adecuada. Las perturbaciones en las vibraciones debido a cambios conformacionales e interacciones entre componentes conducen a la obtención de diferentes espectros y es aquí donde radica la importancia de la técnica en la caracterización de sistemas supramoleculares^{47,64}.

Las aplicaciones de esta técnica son cualitativas y cuantitativas⁶², en el presente trabajo de tesis se recurre a IRTF con el propósito de identificar compuestos y estudiar posibles interacciones entre componentes durante la obtención de los sistemas sólidos.

Condiciones experimentales:

Los espectros fueron tomados en un espectrómetro Nicolet Avatar 360 FTIR. Las mediciones fueron llevadas a cabo con la aplicación de 40 escaneos a una resolución de 8 cm^{-1} en el intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} . Cada una de las muestras se mezcló de manera uniforme con bromuro de potasio (KBr) en una concentración 1% p/p y posteriormente se compactó en una prensa hidráulica.

Análisis de resultados:

El espectro de CLR ha coincidido con el encontrado en bibliografía⁶⁵ y fue posible distinguir las señales correspondientes a las principales vibraciones de la molécula como puede observarse en la Figura 3. Se pueden mencionar el estiramiento de los grupos OH a 3476 cm^{-1} y 3347 cm^{-1} , el del grupo NH a 3262 cm^{-1} y a 3080 cm^{-1} el estiramiento de CH aromático; por otro lado, a 2963 cm^{-1} pudo ser distinguida la señal correspondiente a CH_2 y a 1688 cm^{-1} al grupo CO. Finalmente a menores frecuencias las señales de NH (1560 cm^{-1}) y NO_2 (1524 cm^{-1}) fueron identificadas.

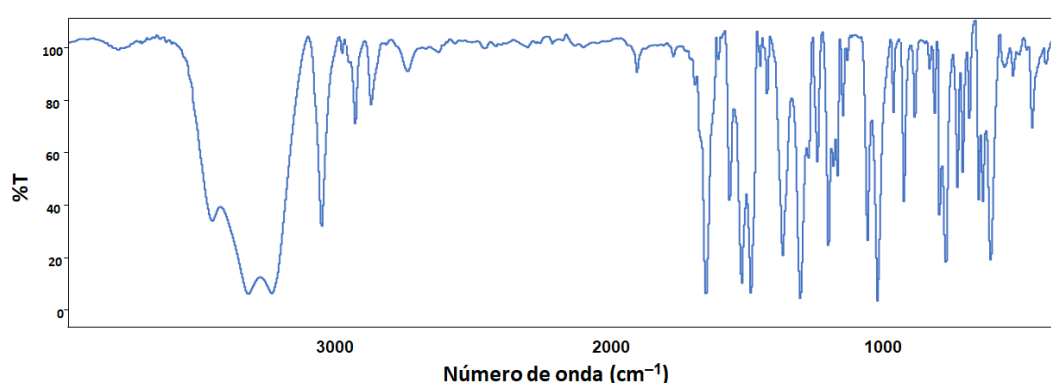


Figura 3. Espectro de IRTF de CLR

En los espectros de los aminoácidos puros también fue posible identificar las bandas que corresponden a los principales grupos funcionales. En el caso de ARG, a 3068 cm^{-1} se reconoció la señal correspondiente al grupo NH y a 2945 cm^{-1} la del CH_3 . Por otro lado, a 1680 cm^{-1} y 1558 cm^{-1} se observaron las bandas originadas a partir de las vibraciones de los grupos NH_2 y CO respectivamente, acorde a la bibliografía consultada^{66,67}.

En el espectro de CIS a 3185 cm^{-1} , 2964 cm^{-1} y 2640 cm^{-1} se pueden identificar las bandas características de las vibraciones de tensión de NH, mientras que el grupo SH es responsable de las bandas que se observaron a 2550 cm^{-1} y 2504 cm^{-1} . A 2080 cm^{-1} se identificó la banda del COO^- y finalmente a 1590 cm^{-1} y 1543 cm^{-1} las vibraciones de NH_2 ⁶⁸.

Al analizar las bandas del espectro de GLI y comparar con espectros de referencia⁶⁹ se identificaron las señales del grupo NH_2 a 3421 cm^{-1} (tensión) y 1582 cm^{-1} (flexión). A un número de onda de 3073 cm^{-1} y 2937 cm^{-1} las vibraciones de tensión de CH. El grupo

CO fue asociado a la banda observada en 1652 cm^{-1} , mientras que a menores frecuencias se identificaron las señales de tensión y flexión de CH_2 (1494 cm^{-1} y 1407 cm^{-1} , respectivamente).

En el caso de LEU, presentó una banda a 2957 cm^{-1} debido a la tensión de CH_2 . La señal que se encontró a 2129 cm^{-1} es producto de la combinación de dos modos fundamentales (correspondientes a vibraciones de C-C y C-N), a 1586 cm^{-1} se observó una banda asociada a la tensión del grupo COO^- y a 1517 cm^{-1} la señal de flexión de CH_3 . Finalmente a 1407 cm^{-1} se identificó una banda atribuida a vibraciones de flexión de CH_3 y CH_2 ⁷⁰.

En todas las combinaciones CLR:AA fue posible observar las bandas características del fármaco (Figura 4). Las señales de los aminoácidos no pudieron ser identificadas en todos los casos por estar superpuestas con las bandas del principio activo; sin embargo, algunas bandas de CLR se presentaron ensanchadas en las MF, debido a la presencia del aminoácido, efecto que también se observó en las combinaciones obtenidas por liofilizado. Esto puede notarse principalmente en la zona donde se aprecian los grupos NH de los aminoácidos, sin verse afectado el número de onda característico de los grupos funcionales de CLR.

Los espectros de los sistemas sólidos obtenidos por liofilización resultaron similares a los de las MF, producto de la superposición de los espectros de los componentes individuales. La ausencia de cambios significativos en las bandas analizadas sugiere que no hay importantes interacciones entre CLR y cada uno de los AA o que no pueden ser detectadas mediante esta técnica. Todas las señales de CLR en las diferentes combinaciones se encuentran detalladas en el Anexo 1 para mayor información.

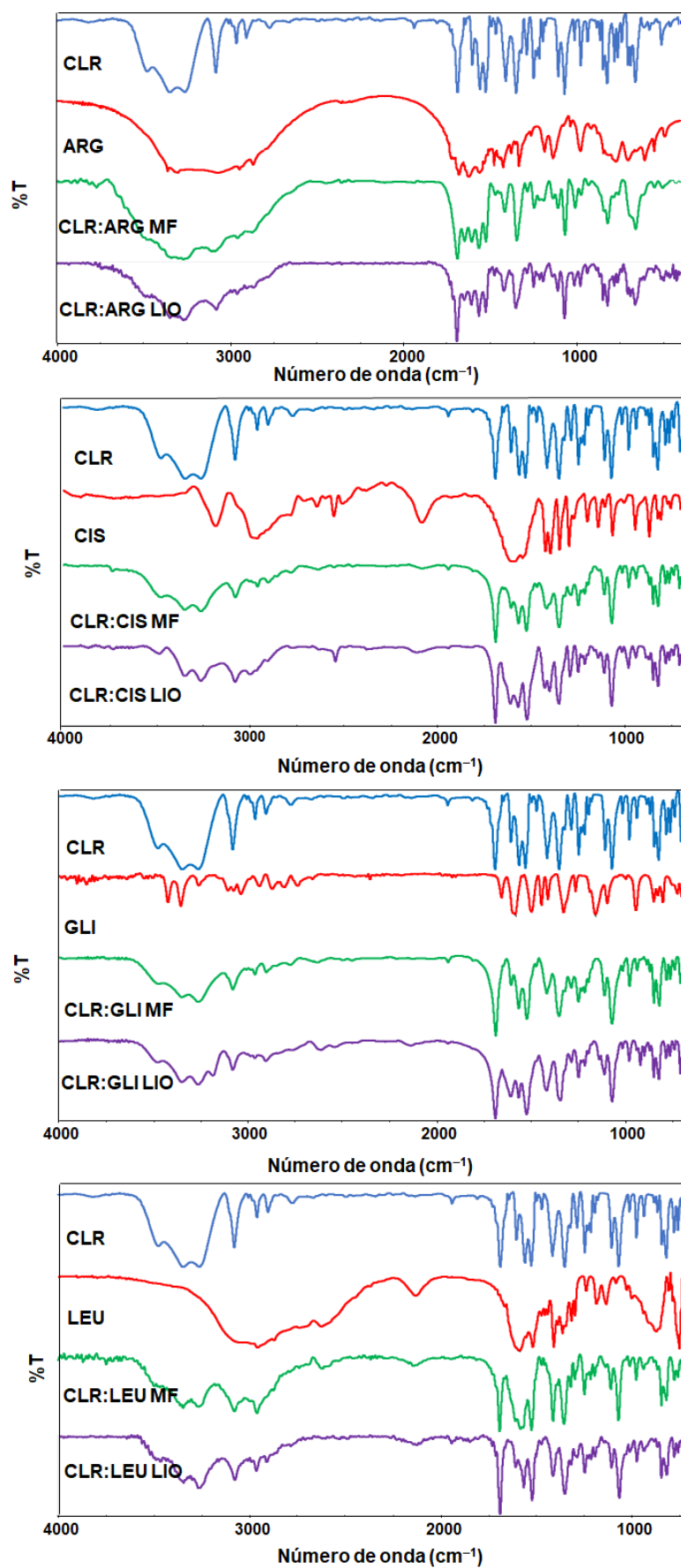


Figura 4. Espectros de IRTF de CLR, AA y las combinaciones CLR:AA

DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVOS (DRXP)

La DRXP es una técnica no destructiva ampliamente utilizada para la caracterización de materiales microcristalinos⁷¹. Se utiliza con fines cuantitativos y cualitativos pero en esta ocasión se centrará la atención en esta última aplicación.

Cuando el ángulo entre la radiación incidente y el conjunto de planos del sólido resulta en una interferencia constructiva se obtiene como resultado un patrón de difracción. Esto responde a las condiciones de Bragg, cuya expresión matemática relaciona la longitud de onda de la radiación de rayos X (λ) y la distancia (d) entre planos paralelos ($\lambda = 2d \sin \theta$).

El patrón de difracción o difractograma es entonces una representación de la intensidad de difracción en función de los valores 2θ y es considerado una huella dactilar de un compuesto sólido⁴⁷. Esto permite identificar un material por comparación con el patrón de referencia y analizar la uniformidad de la fase sólida, la existencia de un polimorfo o una mezcla de ellos y la amorfización de un compuesto, entre otras utilidades. Algunos de los parámetros de difracción de mayor relevancia para el análisis son la posición, ancho e intensidad de los picos⁷¹.

Condiciones experimentales

Las mediciones fueron realizadas en un difractómetro de rayos X de polvos Philips X'Pert PRO en el Laboratorio de Rayos X de CONICET Bahía Blanca, Buenos Aires. Fue utilizada una radiación $\text{CuK}\alpha$, a 45 kV y 30 mA. Los patrones se tomaron en el intervalo $5-40^\circ/2\theta$ con un tamaño de paso de $0,02^\circ$ y un tiempo de 2 s por paso.

Análisis de resultados

El difractograma de CLR (Figura 5) presentó los picos característicos reportados en bibliografía en las posiciones $7,84; 10,66; 12,73; 15,53; 18,77; 19,51; 20,07; 20,60; 25,59; 31,52^\circ 2\theta$ ⁷². Este patrón se conservó en todas las combinaciones analizadas lo que indica que el IFA mantuvo el grado de cristalinidad. No obstante, algunas diferencias en las intensidades de los picos pueden sugerir cambios en el hábito cristalino del sólido^{25,73} debido a la orientación preferencial^{74,75}.

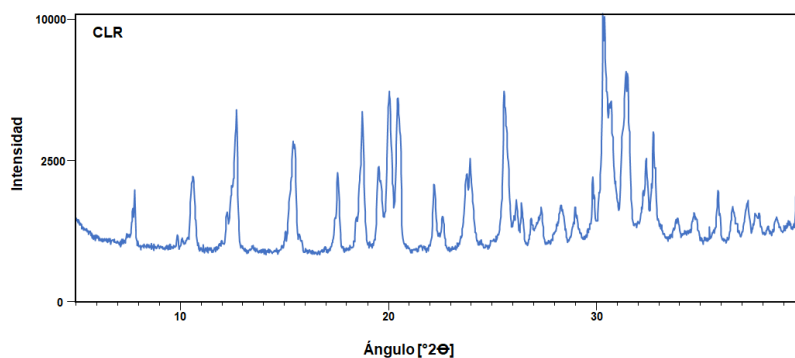


Figura 5. Patrón de difracción de CLR

En las mezclas físicas de los componentes se pudo apreciar la superposición de los difractogramas de los compuestos puros. Mientras que en los sólidos obtenidos por liofilización se observaron algunas modificaciones en los picos correspondientes a los aminoácidos que se detallan a continuación.

En el caso de CLR:ARG LIO, los picos del aminoácido a 14,94; 19,38; 23,04 y 27,33 °2θ, que se observaron en la MF, han perdido intensidad en el sólido liofilizado (Figura 6) lo que puede sugerir la amorfización de ARG. De la misma manera, en las combinaciones con CIS, los picos a 18,15 y 24,5 °2θ correspondientes al aminoácido persistieron en la MF de los componentes, mientras que en el liofilizado no pudieron distinguirse.

Con respecto al sistema sólido obtenido con GLI, las señales a 14,89 y 29,93 °2θ que pudieron identificarse en la MF, no fueron distinguidas en el sólido liofilizado lo que pone en evidencia la pérdida de cristalinidad del aminoácido. Finalmente en CLR:LEU LIO, el patrón de difracción resultó ser equivalente a la sumatoria de los difractogramas de los componentes puros al igual que la mezcla física, los picos del aminoácido se distinguieron con facilidad por lo que es posible afirmar que LEU mantuvo el grado de cristalinidad original.

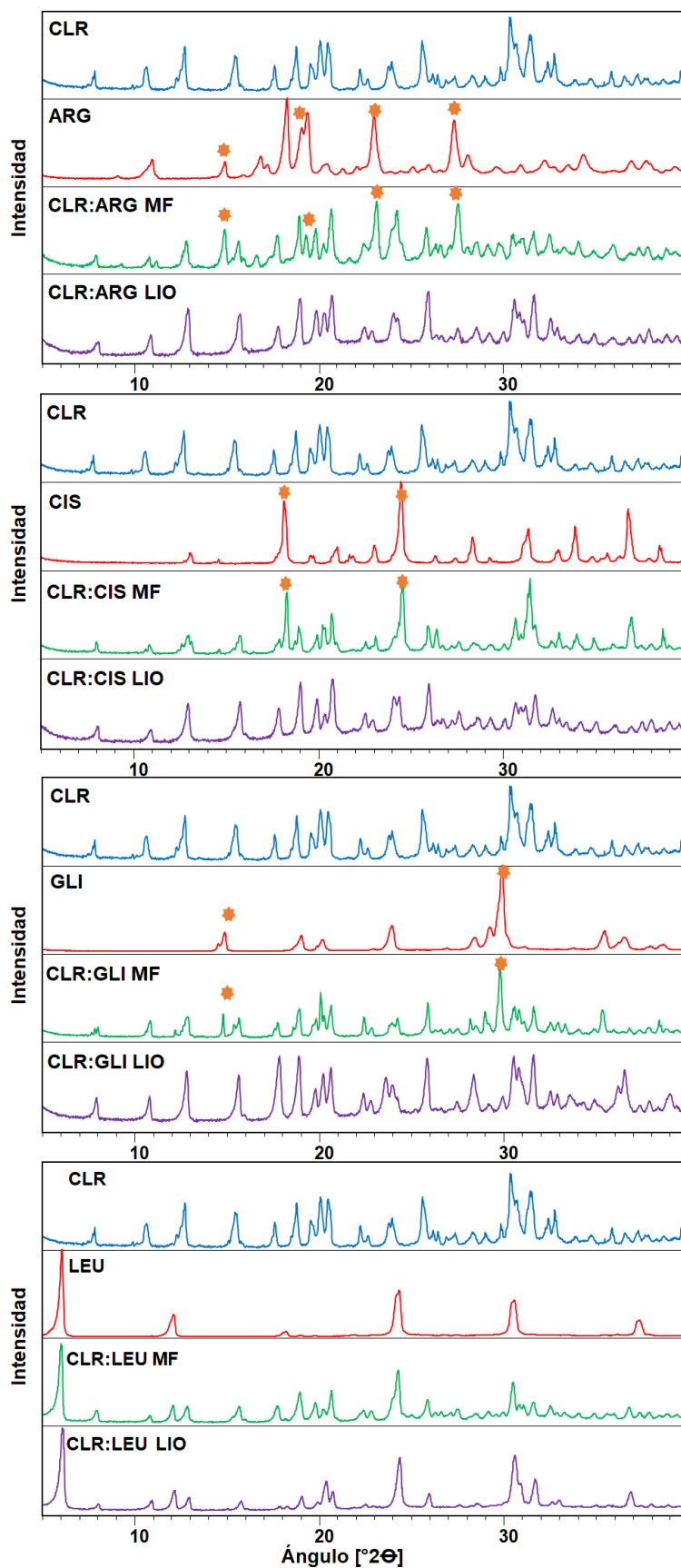


Figura 6. Difractogramas de CLR, AA y las combinaciones CLR:AA. Con un asterisco aparecen marcados los picos de los AA en las MF que han experimentado mayores cambios luego de ser liofilizados con el fármaco

ANÁLISIS TÉRMICO

Análisis térmico es un término que hace referencia a un conjunto de técnicas analíticas que miden propiedades físicas o químicas de una muestra en función de la temperatura o el tiempo bajo condiciones programadas. Contribuye al entendimiento del comportamiento físico de una muestra y permite estudiar las interacciones existentes entre los componentes de una formulación⁶³. Dentro de las principales técnicas se pueden mencionar:

Calorimetría diferencial de barrido (DSC): Es la técnica de análisis térmico más utilizada debido a que puede brindar rápida y fácilmente mucha información sobre un material. Consiste en mantener iguales las temperaturas de la muestra de interés y la referencia cuando son sometidas a procesos de calentamiento o enfriamiento. El equipo mide el flujo de calor involucrado durante transiciones físicas y reacciones químicas de las muestras que van acompañadas de absorciones o desprendimientos de energía³.

Análisis termogravimétrico (TG): Esta técnica mide la variación en el peso de una muestra en función de la temperatura o el tiempo y complementa la información brindada por DSC⁶³. Es posible distinguir pérdidas de solventes así como procesos de descomposición de una sustancia³.

Condiciones experimentales

En este caso las muestras se analizaron por DSC en un equipo TA DSC Discovery. Para los experimentos se pesó una cantidad de muestra de aproximadamente 1 mg en un porta muestra de aluminio y fue analizada con una rampa de 10°C min⁻¹ de 30-170°C bajo una atmósfera de nitrógeno. Por otro lado, los análisis termogravimétricos fueron realizados con un TA TG Discovery series en un rango de 30 a 350°C con la misma rampa de calentamiento utilizada en los estudios de DSC.

Análisis de resultados

CLR puro presentó una endoterma de fusión a 150,9°C como se encuentra reportado en bibliografía⁷⁶ y la degradación comenzó por encima de 190°C. Con respecto al

comportamiento térmico de ARG, se observó la pérdida de agua de hidratación a 99°C, mientras que el punto de fusión no pudo ser detectado debido a que ocurre a temperaturas mayores a las utilizadas en el ensayo (244°C)³².

Los aminoácidos CIS, GLI y LEU también funden a temperaturas altas (240°C⁷⁷, 262°C⁷⁸ y 293°C⁷⁹, respectivamente) por lo que no fue posible observar la endoterma de fusión de estos compuestos bajo las condiciones utilizadas.

En las combinaciones obtenidas por liofilización con CIS, GLI y LEU, el punto de fusión del fármaco no se ha modificado (149,6°C, 150,1°C y 150,0°C respectivamente) con respecto a CLR puro demostrando que no existen interacciones entre los componentes, tal como se pudo observar mediante otras técnicas. En estos casos, no se evidenció pérdida de agua y las muestras se degradaron luego de fundir.

Un panorama diferente se encontró al realizar el análisis de CLR:ARG LIO, donde hasta un 2% de peso de la muestra disminuyó antes de los 100°C en TG, lo que se corresponde con una leve endoterma en el termograma de DSC (pico a 82,7°C). Este fenómeno se atribuye a la pérdida de agua adsorbida en la superficie del sólido, que como interactúa físicamente es removida con facilidad a temperaturas menores a 100°C.

Otro aspecto importante es que la muestra fundió a menor temperatura que el CLR sin procesar (137,8°C), con un rango de fusión más amplio, lo que implica que los componentes de la combinación están interactuando entre sí; además comienza a degradarse durante la fusión lo que nos indica que el sistema es menos estable comparado con el resto de las combinaciones obtenidas. Para mayor detalle, los termogramas se encuentran en la Figura 7.

A partir de este análisis se pudo concluir que, a excepción de la combinación con ARG, el punto de fusión de CLR no se vio afectado en presencia de los aminoácidos estudiados, por lo que puede postularse que no hay interacción entre los componentes. Resulta interesante ver si existe una correlación entre lo observado y el desempeño de disolución y estabilidad de los sistemas sólidos, estudios que serán detallados conforme avance el capítulo.

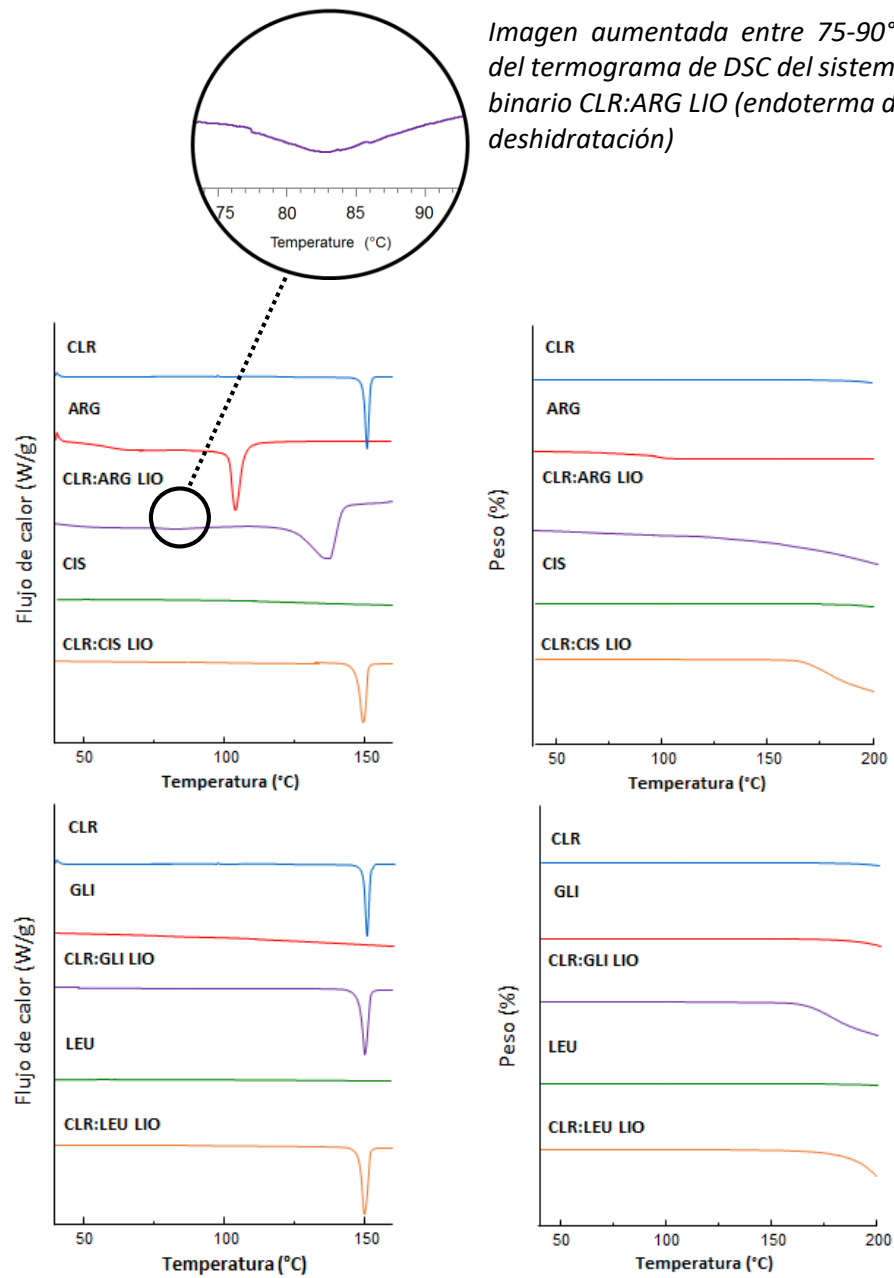


Figura 7. Termogramas de DSC (izquierda) y TG (derecha) de CLR y las combinaciones CLR:AA LIO

ÁNGULO DE CONTACTO

Las características de superficie de los sólidos contribuyen a un mejor entendimiento de su comportamiento en procesos farmacéuticos. La interacción en la interface sólido-líquido puede afectar directamente la estabilidad y propiedades de disolución de un principio activo y depende en gran parte de la humectabilidad del sólido⁸⁰.

La humectabilidad es una de las propiedades más críticas que deben considerarse durante la investigación y desarrollo de productos farmacéuticos, debido a que cambios menores en el grado de humectación de un sólido pueden impactar de forma significativa en los procesos farmacéuticos. La humectabilidad puede verse afectada por cambios fisicoquímicos, procesamiento de la muestra y tamaño de partícula. En general, se determina en función del ángulo que se genera a partir de la interacción de un líquido con una superficie sólida, denominado ángulo de contacto⁸¹.

El ángulo de contacto constituye una de las medidas más comunes utilizadas para indicar el grado de humectabilidad de una superficie o material⁸². El balance entre las fuerzas adhesivas entre el líquido y el sólido y las fuerzas cohesivas del líquido determinará el valor del ángulo formado en la interface (Figura 8)⁸³. Las situaciones a considerar son:

- *Ángulo de contacto menor a 90°*: Las fuerzas adhesivas con la superficie sólida superan a las cohesivas en el líquido. Como resultado el líquido moja la superficie.
- *Ángulo de contacto mayor a 90°*: Las fuerzas cohesivas en el líquido superan a las adhesivas con la superficie sólida. En este caso se trata de un material de pobre humectabilidad.

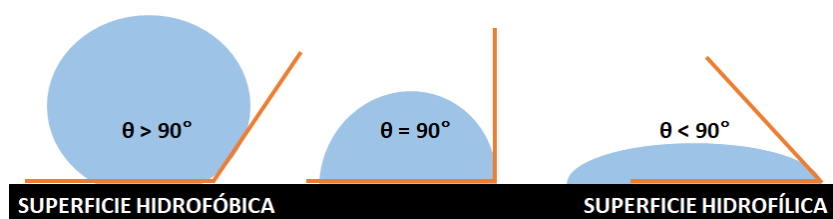


Figura 8. Representación esquemática de la interacción de una gota de agua con diferentes sustratos.

Dentro de los métodos más comunes utilizados para medir el ángulo de contacto se pueden mencionar la técnica de la gota sésil, método del plato (Wilhelmy) y de absorción de columna⁸⁴.

Condiciones experimentales

El método de la gota sésil (Figura 9)⁸³ es uno de los más utilizados para el análisis del ángulo de contacto y consiste en la medición del ángulo tangente en el punto interfacial. Se caracteriza por la simplicidad de operación, requerimiento de una pequeña área superficial de sustrato y pocas cantidades de líquido.

Las determinaciones fueron llevadas a cabo en un goníometro de ángulo de contacto casero⁸⁵ desarrollado en el Departamento de Físicoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC. En esta técnica, una gota de agua destilada es instilada sobre la muestra fijada sobre una superficie lisa con cinta doble faz. Los experimentos fueron registrados con una cámara CMOS a 15 marcos por segundo. Cada video fue procesado con el software SPANISH-DUB, las imágenes seleccionadas fueron guardadas en formato BMP y posteriormente convertidas a 8 bit con el programa de procesamiento de imagen Image J. Para las determinaciones fue utilizado un plugin LB-ADSA (del inglés *Low Bond Axisymmetric Drop Shape Analysis por Aurélien Stalder*)^{86,87}.

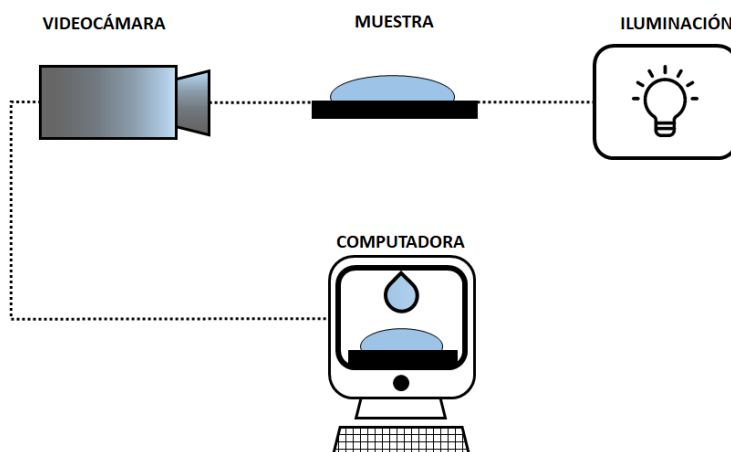


Figura 9. Representación gráfica del método de la gota sésil

Análisis de resultados

En el caso de CLR el ángulo resultó menor a 90° y la gota se esparció de forma rápida sobre la superficie del sólido poniendo en evidencia la buena humectabilidad del fármaco. No fue posible medir con exactitud dicho ángulo debido a que el ajuste de

ángulos menores a 90° lleva asociado muchos errores mediante la técnica utilizada. En bibliografía se ha informado que CLR presenta un ángulo de humectación de 59° ⁶⁴.

Al analizar las combinaciones con ARG, GLI y CIS obtenidas mediante liofilización, el comportamiento resultó similar a CLR puro, ya que los sólidos se humectaron rápidamente y los ángulos de contacto fueron menores a 90° en todos los casos.

Por otro lado, en CLR:LEU LIO el ángulo fue de $107,9 \pm 0,9^\circ$, lo que significa que el grado de humectabilidad se ha reducido en presencia de este aminoácido. Esto puede deberse a que LEU presenta características hidrófobas⁸⁸ lo que lleva a que la capacidad de humectación del sólido sea menor. En la Figura 10 se presentan las fotografías tomadas durante la determinación del ángulo de contacto.

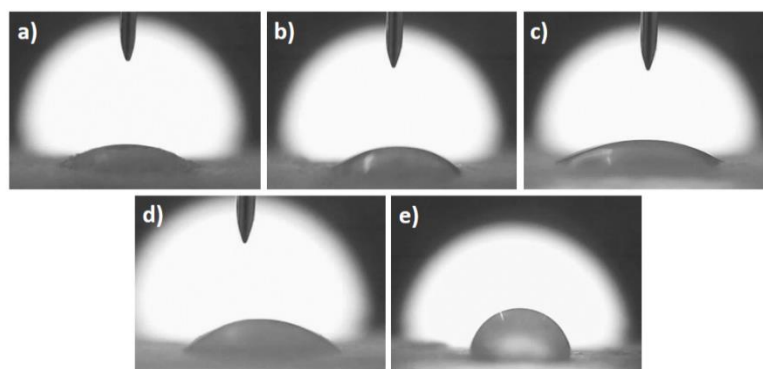


Figura 10. Fotografías tomadas durante la determinación del ángulo de contacto a) CLR, b) CLR:ARG LIO, c) CLR:CIS LIO, d) CLR:GLI LIO y e) CLR:LEU LIO

A partir de lo analizado es posible establecer que el grado de humectación de CLR se vio modificado a partir de la combinación con LEU, mientras que en los sistemas binarios restantes no se apreciaron diferencias con respecto al comportamiento del fármaco puro. Para poder deducir si lo observado se traduce en modificaciones en el comportamiento de disolución de los polvos, se realizaron ensayos de velocidad de disolución cuyo desarrollo será explicado en puntos posteriores.

MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRÓNICO (SEM)

La microscopía constituye una herramienta versátil que permite analizar forma y tamaño de las partículas, propiedades de superficie, ópticas y cristalográficas⁶³.

A diferencia de los microscopios ópticos, la microscopía electrónica se basa en el uso de electrones, que al tener una longitud de onda más corta que los fotones, permite observar la materia con resolución atómica y obtener imágenes con alta magnificación y resolución⁸⁹.

Como resultado de las interacciones entre un haz de electrones de alta energía y la materia se producen emisiones de diferente tipo que pueden proporcionar información sobre la topografía, composición y estructura cristalográfica de la muestra⁹⁰.

Las imágenes obtenidas a partir del detector de electrones secundarios presentan un alto contraste y muestran un gran detalle de la superficie como grietas, elevaciones, y texturas⁶³.

Por otro lado, los electrones retrodifundidos, producto de una dispersión elástica del haz electrónico, tienen mayor energía que los electrones secundarios. Las imágenes generadas muestran variaciones en la composición química donde, de acuerdo al número atómico promedio, se observan zonas con diferente brillo. Como estos electrones son arrancados de zonas de mayor profundidad, no brindan mucho detalle de la superficie⁶³.

Finalmente, los rayos X son emitidos cuando el haz de electrones interactúa de manera inelástica con la muestra. Debido a que la energía y longitud de onda del fotón de rayos X dependen del tipo de átomo, esta emisión puede ser aplicada para el análisis elemental de un material⁶³.

Condiciones experimentales

La morfología y el tamaño de partículas fueron estudiados en el microscopio de barrido electrónico (Carl Zeiss Sigma) del Laboratorio de Microscopia y Análisis por Rayos X (LAMARX) de la Universidad Nacional de Córdoba. Las muestras se fijaron mediante una cinta adhesiva de doble faz en un soporte metálico y se recubrieron con oro/paladio en un metalizador Quorum 150 para favorecer la conductividad. Las muestras fueron irradiadas con 5 eV y las microfotografías que se presentan en la

sección de resultados fueron tomadas con el detector de electrones secundarios por lo que se pueden apreciar con gran detalle las características superficiales.

Análisis de resultados

Se ha demostrado que el hábito cristalino de un fármaco tiene inferencia sobre sus propiedades mecánicas, estabilidad y desempeño de disolución y por lo tanto puede afectar la biodisponibilidad de dicho principio activo^{24,91}. La SEM constituye una herramienta que ha permitido estudiar el tamaño y la morfología de las partículas con gran detalle.

Las microfotografías (Figura 11) han mostrado diferencias en el hábito cristalino de CLR en todas las combinaciones CLR:AA LIO con respecto a CLR puro, así como un menor tamaño de partícula. Se han podido observar cristales alargados y ahuecados en el interior.

Esta morfología en particular se caracteriza por una mayor área superficial y no ha sido demasiado estudiada en el área farmacéutica. Sólo unos pocos IFA como acetato de dexametasona, carbamazepina, deflazacort y diclofenac han sido reportados por presentar este tipo de hábito cristalino²⁷.

En este caso, las partículas presentaron una pared con grosor de $1,4 \pm 0,4 \mu\text{m}$ y un diámetro del poro de alrededor de $5 \mu\text{m}$ en las combinaciones con ARG, CIS y GLI, mientras que los sólidos obtenidos en presencia de LEU exhibieron un poro de $25 \mu\text{m}$ de diámetro aproximadamente.

Las partículas de CLR sin procesar presentaron una gran dispersión de tamaño, con valores de 50 a $600 \mu\text{m}$, por lo que se observó una reducción en el tamaño a partir de las combinaciones con los aminoácidos obtenidas mediante liofilización. En los sistemas con ARG y CIS las partículas fueron similares, con un largo promedio de $100 \mu\text{m}$. En presencia de GLI las partículas presentaron un largo de $200 \mu\text{m}$ y con LEU $350 \mu\text{m}$.

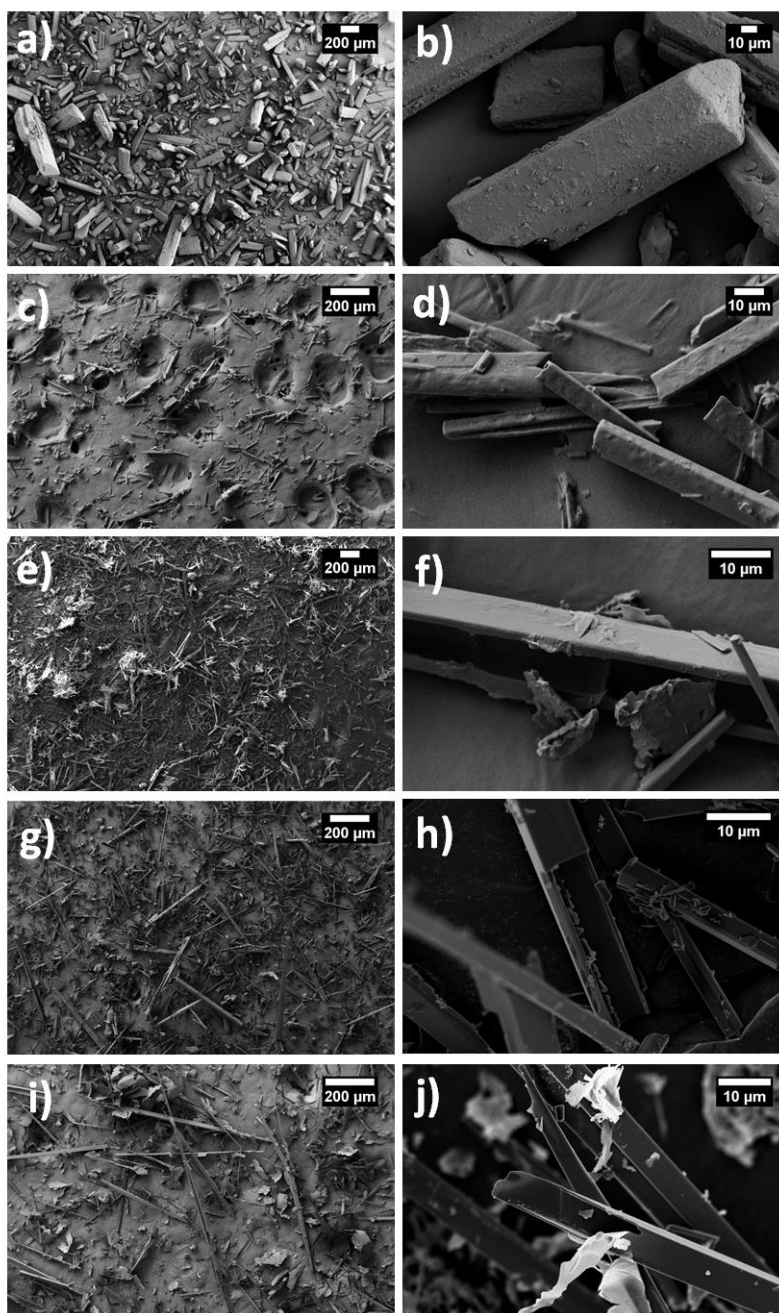


Figura 11. Imágenes de SEM de CLR (a, b); CLR:ARG LIO (c,d); CLR:CIS LIO (e, f); CLR:GLI LIO (g, h); CLR:LEU LIO (i, j)

También se obtuvieron imágenes a partir de la liofilización de CLR en ausencia de los aminoácidos y como se puede observar en la Figura 12, las partículas del fármaco presentaron un menor tamaño que el CLR sin procesar, sin embargo se caracterizaron por no tener una morfología uniforme. Se pudieron apreciar cristales alargados de superficie lisa, algunas partículas de superficie irregular y rugosa, incluso pequeñas esferas y rosetas constituidas por cristales delgados de 10 μm de largo. Debido a la

heterogeneidad de la muestra, no se han continuado con los estudios de caracterización de CLR LIO.

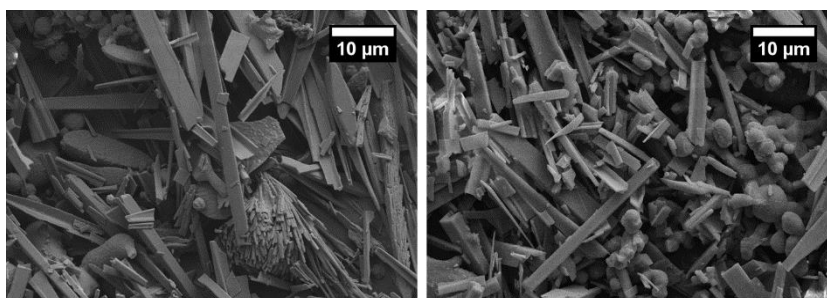


Figura 12. Imágenes de SEM de CLR LIO

En los sistemas binarios, la obtención de partículas ahuecadas en el interior, puede estar relacionada a que, bajo las condiciones de vacío en las que se realiza la liofilización y ante la sublimación del agua, se crea un medio de supersaturación donde se pueden dar las condiciones para la cristalización del principio activo en un hábito diferente²⁴. La presencia de un agente auxiliar para favorecer la nucleación también puede ser un factor determinante, en este caso es posible que el agregado de los aminoácidos haya favorecido el proceso debido a que, la liofilización de CLR en ausencia de un segundo componente, no conduce a la obtención de cristales con el hábito cristalino observado.

Estos resultados han sido de gran interés dado a que la liofilización suele conducir a la obtención de sólidos amorfos^{92,93}. Otro aspecto llamativo es el hábito cristalino de las partículas obtenidas debido a la estructura ahuecada en el interior, morfología que se suele obtener a partir de evaporación de solventes orgánicos²⁵.

Ante este nuevo panorama, es de esperarse que los sistemas binarios presenten un mejorado desempeño de disolución, debido al menor tamaño de partícula y al aumento de la superficie expuesta del sólido.

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ESTADO SÓLIDO (RMNs)

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica que mide la energía asociada con la reorientación de determinados núcleos en presencia de un campo magnético. En particular, RMN de alta resolución de estado sólido (RMNs) es una metodología analítica no destructiva que complementa la cristalografía de rayos X y brinda información estructural relevante en la caracterización del estado sólido. La alta resolución se logra mediante la rotación al ángulo mágico y desacoplamiento de protones de alta potencia⁹⁴.

La cantidad de señales del espectro, sus posiciones e intensidades proporcionan información sobre la estructura de un compuesto químico o una mezcla de ellos. A su vez, el desdoblamiento de las señales es capaz de determinar el número de moléculas independientes por celda unidad en un cristal.

La RMNs ha cobrado mucha importancia dentro de las técnicas analíticas en el último tiempo debido a que aproximadamente un 80-90% de los productos farmacéuticos en el mercado existen en forma sólida⁹⁵, por lo que es importante que las técnicas de análisis utilizadas se adapten a esta condición.

Condiciones experimentales:

Los espectros de ^{13}C de RMNs de alta resolución fueron tomados con rotación al ángulo mágico combinada con polarización cruzada con desacople de protones durante las adquisiciones. Estos experimentos fueron realizados a temperatura ambiente en un espectrómetro Bruker Avance II, operando a una frecuencia de Larmor de protones de 300,13 MHz equipado con un cabezal de MAS de 4 mm. La frecuencia de operación para carbono fue de 75,46 MHz. Glicina fue utilizada como referencia externa y para la calibración. Los espectros fueron tomados con 1600 scans con 2 ms de contacto con un tiempo de relajación de 5 s. La velocidad de rotación para todas las muestras fue de 10 kHz. Estos ensayos fueron realizados en colaboración con el Dr. Gustavo A. Monti del Instituto de Física Enrique Gaviola (IFEG, CONICET) y de la Facultad de Matemática, Astronomía y Física, UNC, Córdoba.

Análisis de resultados:

En la Figura 13 se muestran los espectros de los compuestos puros CLR, ARG, CIS, GLI y LEU y las estructuras moleculares con la numeración de carbonos correspondientes a cada uno. Es importante destacar que los espectros ^{13}C han revelado un alto grado de cristalinidad en todas las combinaciones.

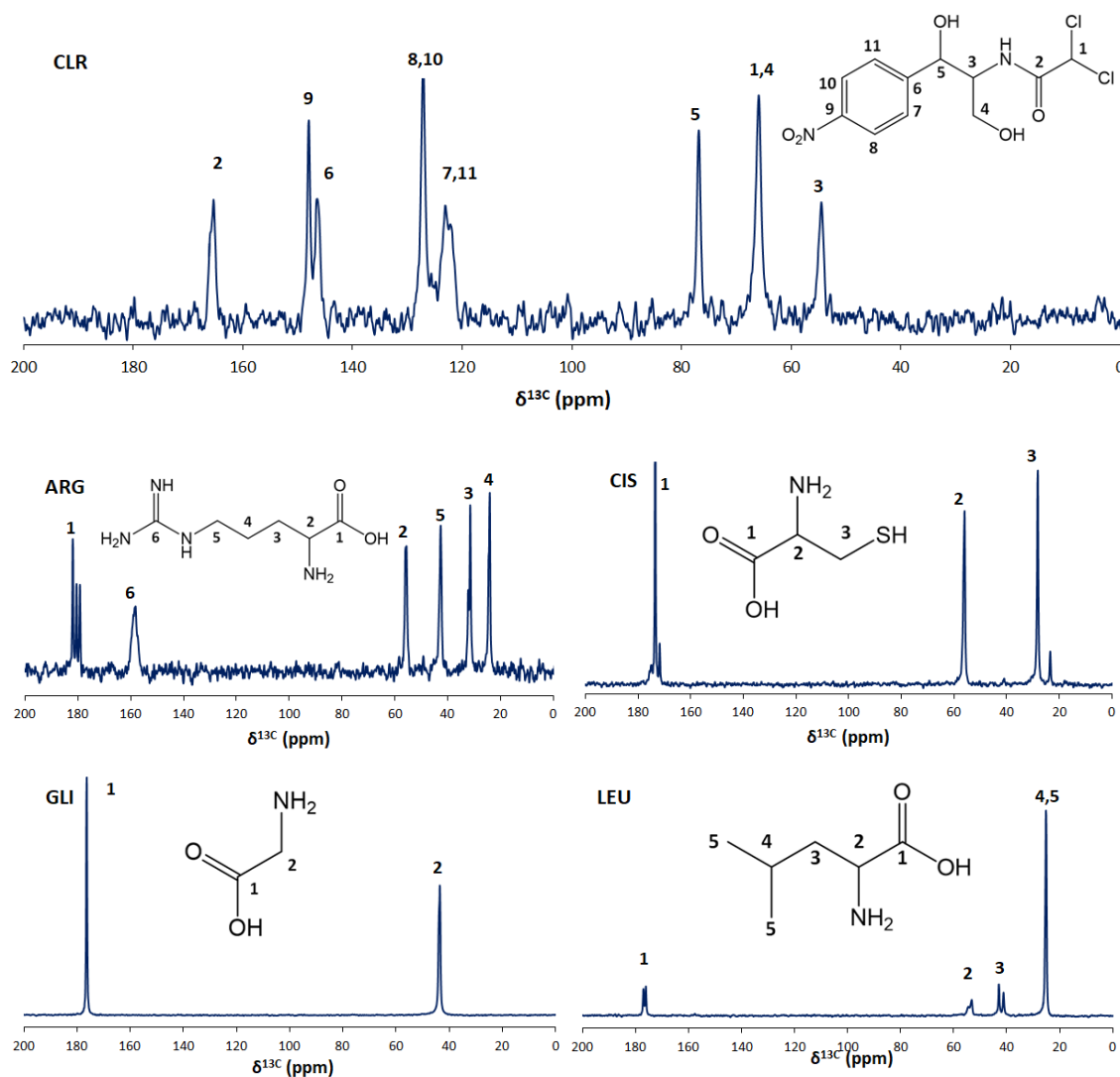


Figura 13. Espectros de RMNs de los compuestos puros CLR, ARG, CIS, GLI, LEU con la asignación de señales correspondiente

En la Figura 14 se muestra la comparación entre las MF y LIO de las distintas combinaciones CLR:AA. En los espectros de las MF, las señales de los aminoácidos fueron diferenciadas de las correspondientes a CLR con un asterisco.

En todos los casos de CLR:AA MF, los espectros resultaron ser la superposición de los espectros de los componentes individuales, sin evidenciar la producción de

interacciones durante el mezclado. Por otro lado, cuando se compararon los espectros de cada una de las MF con las combinaciones obtenidas por liofilización, es posible obtener información sobre las modificaciones estructurales en el fármaco y los aminoácidos.

El espectro ^{13}C de CLR:ARG LIO ha diferido en gran medida del espectro de CLR:ARG MF, debido a que las señales del aminoácido se ven ensanchadas y se observaron algunas modificaciones en el desplazamiento químico. Por otro lado, las señales de CLR no evidenciaron cambios en los espectros de las MF y LIO.

El mismo comportamiento fue observado en el caso de CLR:CIS LIO donde el ancho de las señales del aminoácido se vio incrementada. Una observación interesante fue el desdoblamiento de algunas señales de este aminoácido luego del proceso de liofilización, como por ejemplo la línea correspondiente al C3*, mientras que la estructura de CLR no se vio modificada debido a que no se observaron cambios en los corrimientos químicos ni en el ancho de las señales.

El espectro ^{13}C de CLR:GLI MF fue similar al de CLR:GLI LIO y sólo las señales del aminoácido experimentaron modificaciones, demostrando una disminución en el grado de cristalinidad de GLI sin afectar la forma sólida del fármaco.

Finalmente, los espectros de ^{13}C de CLR:LEU LIO y MF resultaron similares y los corrimientos químicos no mostraron modificaciones importantes. LEU logra mantener el grado de cristalinidad original a diferencia del resto de los aminoácidos, donde las señales pierden intensidad luego del proceso de obtención y aparecen ensanchadas. En ninguno de los casos pudieron notarse alteraciones en las señales características del fármaco. Para un mayor detalle se pueden observar los corrimientos químicos de las muestras analizadas en el material complementario (Anexo 2).

Se puede concluir que, mientras CLR mantuvo su estado cristalino, los aminoácidos, a excepción de LEU, se amorfizaron durante el proceso de liofilización, como ha podido apreciarse también mediante DRXP.

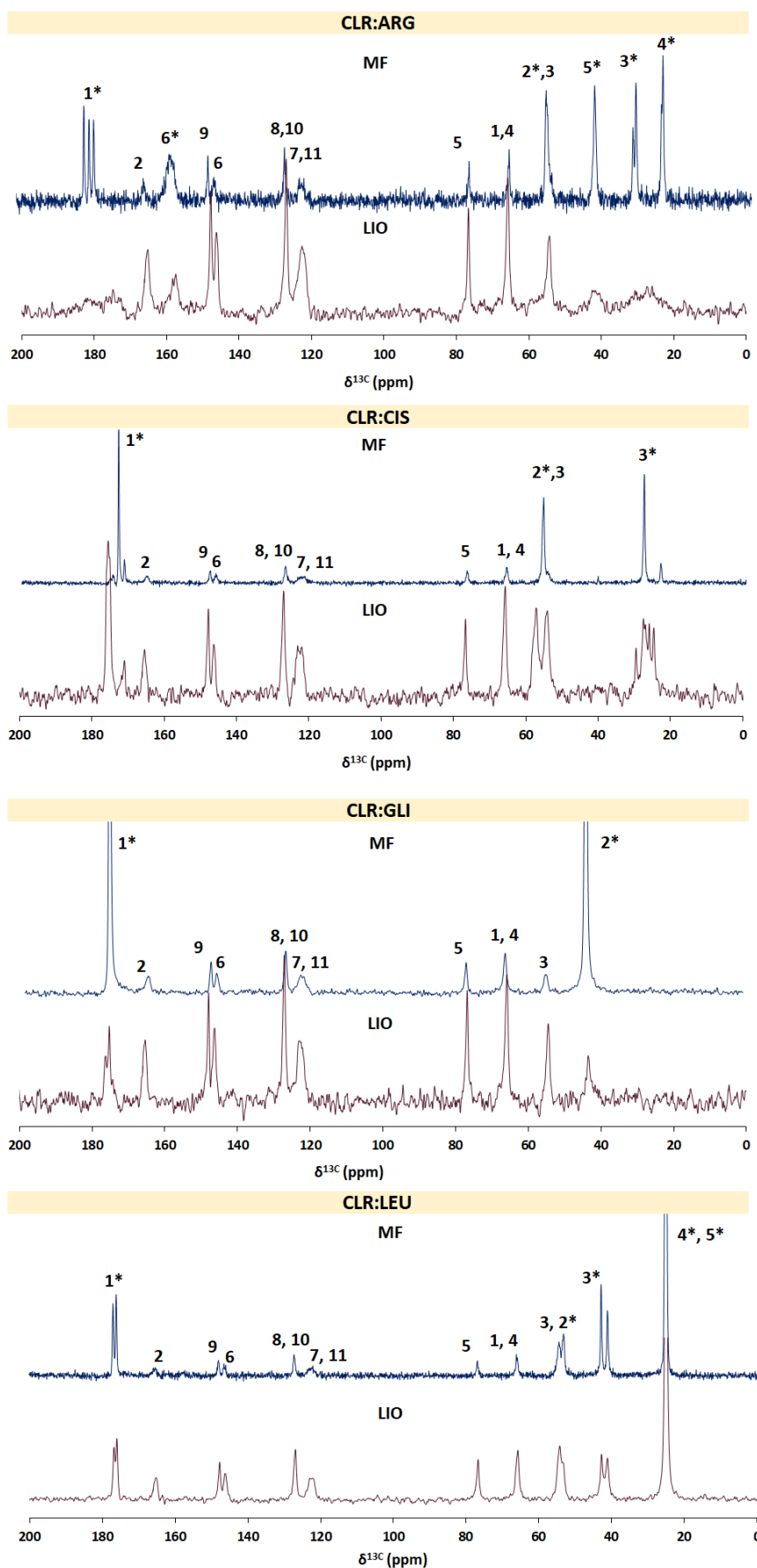


Figura 14. Espectros de RMNs de las combinaciones CLR:AA MF y CLR:AA LIO (Las señales correspondientes a los aminoácidos son señaladas con un asterisco)

ESTUDIOS DE DISOLUCIÓN

El ensayo de disolución es una herramienta comparativa para evaluar el desempeño *in vitro* de una forma farmacéutica sólida. La disolución de un producto sólido puede verse afectada por la composición y las propiedades de los polvos, incluyendo tamaño de partícula, estructura polimórfica del IFA contenido en la formulación, excipientes y factores propios del método y medio de disolución. Por lo tanto, este ensayo es utilizado comúnmente en el diseño y selección de formulaciones, para el control de calidad y para evaluar la consistencia lote a lote durante la manufactura de productos farmacéuticos⁹⁶.

Dos de los métodos más utilizados, que se encuentran en muchos de los compendios oficiales, son el aparato I o de canastilla y el II o de paleta (Figura 15). El primero es utilizado para cápsulas y comprimidos flotantes, por lo cual en este trabajo de tesis se ha utilizado el aparato II⁹⁷, empleado para polvos y comprimidos.

En el método de paleta, la muestra se coloca en el vaso con el medio de disolución y la paleta gira a la velocidad establecida. Se toman muestras a intervalos determinados, se filtran de forma inmediata para eliminar partículas no disueltas y se analiza el contenido de fármaco en la alícuota por el método más adecuado.

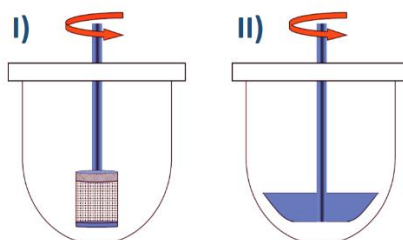


Figura 15. Ilustración esquemática del aparato I (canastilla) y II (paleta)

Estos ensayos fueron realizados con las muestras en polvo, sin comprimir, para evitar modificaciones en la forma polimórfica o hábito cristalino que pueden tener lugar durante la compactación⁹⁸.

Para comparar los perfiles de disolución se utilizaron los factores de diferencia (f_1) y de similitud (f_2)⁹⁹. El factor f_1 (ecuación 1) calcula la diferencia porcentual entre dos curvas en cada punto temporal y es una medida del error relativo entre dos perfiles de disolución. Se calcula mediante la siguiente ecuación matemática:

$$f_1 = \{[\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|] / [\sum_{t=1}^n R_t]\} 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

donde n es el número de puntos temporales, R_t es el valor de disolución del compuesto de referencia (fármaco puro, CLR en este caso) en el tiempo t y T_t es el valor de disolución del fármaco a partir del sistema en estudio (CLR:AA LIO) en el mismo tiempo. Valores de f_1 de hasta 15 (0-15) aseguran la igualdad o equivalencia entre las dos curvas.

El valor de similitud o f_2 (ecuación 2), por otro lado, es una transformación de la raíz cuadrada recíproca logarítmica de la suma del error cuadrado y es una medida de la similitud en la disolución porcentual entre las dos curvas. Los valores de f_2 mayores a 50 (50-100) aseguran la igualdad o equivalencia entre las dos curvas comparadas.

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \right\} 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Condiciones experimentales:

Los estudios de velocidad de disolución de CLR puro y las combinaciones fueron llevados a cabo en un disolutor Hanson SR11 6 Flask Dissolution Test Station, Hanson Research Corporation (Chatsworth, USA), con el método de paletas de acuerdo a USP (Farmacopea de Estados Unidos, del inglés United States Pharmacopeia)¹⁰⁰. Una cantidad de 100 mg de CLR y su equivalente de CLR:AA LIO fue añadido a 900 ml de medio de disolución (medio gástrico simulado pH 1,2) mantenido a $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ agitado a 50 RPM. Se tomaron alícuotas de 2 ml a intervalos regulares de tiempo y se agregó un volumen de medio igual al extraído a la misma temperatura. Este proceso es considerado en el cálculo debido a que la muestra en el vaso se diluye conforme avanza el ensayo y es necesario corregir la concentración a partir del volumen extraído en cada toma. El porcentaje acumulado de CLR fue determinado espectrofotométricamente a 278 nm, para lo cual se construyó la curva de calibración correspondiente:

$$y = 10282,78 M^{-1}x + 0,0015 \quad r^2 = 0,999$$

Análisis de resultados:

Los perfiles de disolución de CLR y de las combinaciones CLR:AA LIO pueden observarse en la Figura 15. Transcurridos los primeros 10 min del ensayo, la cantidad de

fármaco que se logró disolver a partir de CLR:ARG LIO fue de $98 \pm 3 \%$, en CLR:CIS LIO $66 \pm 5 \%$, $73 \pm 7 \%$ para el caso de CLR:GLI LIO y por último $97 \pm 1 \%$ en la combinación CLR:LEU LIO, mientras que el IFA logró disolverse un $55 \pm 1 \%$ en el mismo tiempo de ensayo.

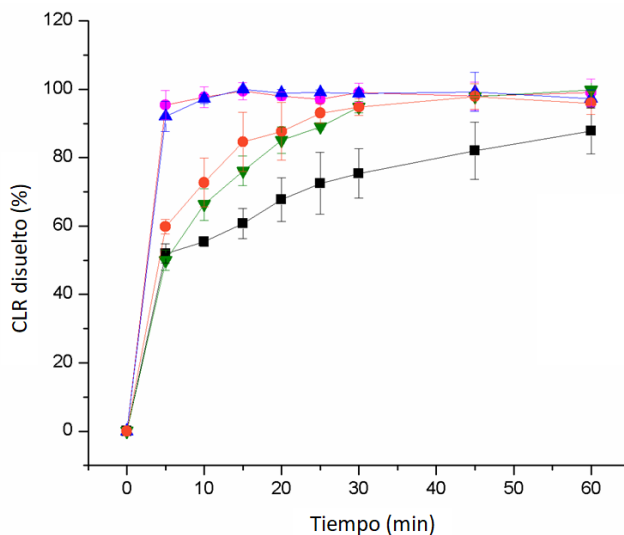


Figura 15. Perfiles de disolución obtenidos para •CLR, •CLR:ARG LIO, ΔCLR:CIS LIO, •CLR:GLI LIO y ΔCLR:LEU LIO

Los factores f_1 y f_2 fueron calculados para comparar las similitudes de los perfiles obtenidos a partir de las combinaciones binarias con respecto al desempeño del principio activo puro. En todos los casos los valores de f_1 resultaron mayores a 15 y f_2 menores a 50 lo que indica que los perfiles de CLR:AA LIO resultaron diferentes al exhibido por el principio activo puro. En la Tabla 2 pueden observarse los valores de f_1 y f_2 para todas las combinaciones.

Los valores más altos de f_1 y más bajos de f_2 se obtuvieron para los sistemas CLR:ARG LIO y CLR:LEU LIO, lo que coincide con lo observado en la Figura 15.

Tabla 2. Valores de f_1 y f_2 obtenidos para las combinaciones CLR:AA LIO con respecto a CLR

	f_1	f_2
CLR:ARG LIO/ CLR	42	27
CLR:CIS LIO/ CLR	20	43
CLR:GLI LIO/ CLR	24	39
CLR:LEU LIO/ CLR	42	27

Las combinaciones CLR:AA LIO permitieron mejorar la velocidad de disolución de CLR, comparado con el principio activo sin procesar. Esta mejora en el desempeño puede deberse al cambio en la morfología de los cristales, como pudo observarse mediante SEM, debido a que la estructura tubular ahuecada en el interior incrementa la superficie expuesta del sólido.

El tamaño de partícula puede explicar el aumento en la velocidad de disolución, sin embargo, no significa que el sistema sólido con menor tamaño de partícula, presente el mejor comportamiento, por ejemplo, CLR:CIS LIO se caracterizó por partículas más pequeñas que CLR:LEU LIO y sin embargo, éste último sistema se disuelve más rápido que el primero en el medio utilizado.

Por otro lado, el grado de humectación del sólido no es un factor determinante en el efecto observado, debido a que no se pudo establecer una correlación entre el ángulo de contacto y la velocidad de disolución. Esto puede explicarse debido a que el sistema CLR:LEU LIO presentó características hidrófobas y, junto con CLR:ARG LIO, fueron las combinaciones con mejor comportamiento.

En puntos posteriores del capítulo, se desarrollarán estudios que tienen por objetivo demostrar que, ante esta nueva perspectiva, otros atributos del fármaco, como la actividad microbiológica y la estabilidad, no resulten afectados.

ENSAYO DE ACTIVIDAD MICROBIOLÓGICA

Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana pueden ser utilizadas en el descubrimiento y desarrollo de fármacos, evaluación de tratamientos farmacológicos y estudios epidemiológicos¹⁰¹. Existen varios métodos para evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* pero uno de los más utilizados y simples es el método de difusión desde discos en agar, también llamado difusión en placa¹⁰².

En este ensayo, discos de papel de filtro de aproximadamente 6 mm de diámetro embebidos en el compuesto a ensayar se colocan en la superficie de la placa con el medio de cultivo inoculado con el microorganismo de interés. Luego se dejan incubar las placas de Petri bajo las condiciones establecidas.

El antimicrobiano difunde desde el disco a través del medio de cultivo en forma radial produciendo una zona de inhibición (Figura 16) donde no hay crecimiento bacteriano, dicha región puede medirse e indica el grado de sensibilidad del microorganismo frente a un determinado compuesto¹⁰³.

Este análisis provee información cualitativa y es utilizado con frecuencia en la clínica para la selección del tratamiento antibiótico más adecuado¹⁰⁴. Sin embargo, en esta ocasión se recurre a dicho ensayo para comparar las zonas de inhibición producidas por CLR puro y por las combinaciones sólidas para poder establecer si la actividad antimicrobiana se ve afectada ante el agregado de los aminoácidos.

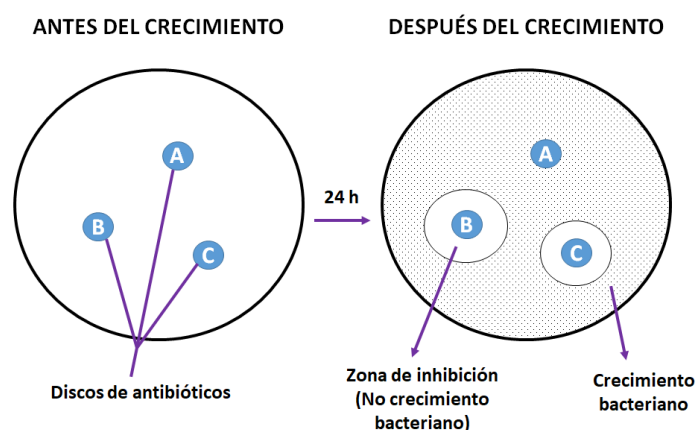


Figura 16. Ilustración del método de difusión en placa

Condiciones experimentales

Este ensayo fue realizado en colaboración con la Dra. Virginia Aiassa de la Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA). Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana fueron realizadas según el ensayo desarrollado por Zuorro et al.¹⁰⁵ con algunas modificaciones. Cepas de *Escherichia coli* ATCC® (American Type Culture Collection) 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 fueron sembradas en la superficie de placas con agar Mueller Hinton con un hisopo estéril empapado en la suspensión bacteriana diluida a 10⁶ unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml). Un disco de 6 mm de membrana estéril Whatman N° 1 inoculado con 10 µl de una solución que contiene CLR puro (30 µg) o las combinaciones CLR:AA LIO fue colocado sobre la placa. Las soluciones de los aminoácidos ARG, CIS, GLI y LEU puros fueron utilizadas como control. Se dejó incubando 24 h a 37°C, las placas se examinaron y se midieron los diámetros de los halos de inhibición. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Análisis de resultados

Se corroboró que los aminoácidos puros no exhiben actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *E. coli*. El ensayo mostró que no existen diferencias significativas entre la zona de inhibición producida por CLR puro y las combinaciones CLR:AA LIO en las especies bajo estudio (Tabla 3). De esta manera, se ha demostrado que la presencia de los AA en estas combinaciones, en las que el principio activo conserva el grado de cristalinidad, no interfiere con la actividad microbiológica del fármaco. Estos resultados son importantes debido a que se espera que los aminoácidos produzcan efectos positivos en parámetros como velocidad de disolución y estrés oxidativo, sin afectar la actividad antimicrobiana de CLR.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de CLR puro y de las combinaciones CLR:AA LIO

Muestra	Halo de inhibición (mm) Promedio ± DE	
	<i>S. aureus</i> 25923	<i>E. coli</i> 25922
CLR	27,5 ± 0,5	30 ± 1
CLR:ARG LIO	28,5 ± 0,5	29,5 ± 0,5
CLR:CIS LIO	27 ± 1	31,5 ± 0,5
CLR:GLI LIO	27,5 ± 0,5	28,5 ± 0,5
CLR:LEU LIO	27,5 ± 0,5	28,5 ± 0,5

ANÁLISIS DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)

Los radicales libres se generan de manera natural como subproductos del metabolismo y tienen una importante función en la señalización molecular para regular procesos biológicos. Son moléculas de bajo peso molecular con uno o más electrones desapareados¹⁰⁶, lo que les confiere una elevada capacidad de reacción con estructuras celulares.

El estado rédox de la célula es crítico para su viabilidad, activación, proliferación y funcionalidad. Bajo determinadas condiciones, los niveles de estas especies reactivas pueden decaer o aumentar fuera de los límites normales y conducir a daños en las funciones fisiológicas del organismo (Figura 17)¹⁰⁷.

Las defensas antioxidantes incluyen sistemas no enzimáticos (vitaminas, glutatión) y enzimas como catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx), que contrarrestan y regulan los niveles de ERO para mantener la homeostasis^{107,108}.

El incremento en los niveles de los radicales libres por encima de los valores considerados normales se conoce como estrés oxidativo; debido a la elevada reactividad de estas especies frente a blancos biológicos se producen efectos tóxicos sobre ADN, lípidos y proteínas.

El estrés oxidativo contribuye al envejecimiento¹⁰⁷ y a la producción de enfermedades como cáncer, desórdenes neurológicos, aterosclerosis y diabetes¹⁰⁸. Se ha demostrado que en células cancerígenas hay un mayor nivel de ERO en comparación con una célula normal, lo que induce la proliferación y diferenciación celular¹⁰⁹.

Los antecedentes sobre CLR y los efectos tóxicos que produce, señalan que su propensión a causar daño en los órganos hematopoyéticos puede estar relacionada con el potencial de nitro-reducción y producción posterior de óxido nítrico. Esta observación sugiere que el grupo nitro puede ser la causa de hematotoxicidad en personas susceptibles a este antibiótico¹¹⁰. Por otro lado, los resultados obtenidos por Eraso y Albasa¹¹¹ demostraron que las células sanguíneas sufren estrés oxidativo en presencia de CLR, ya que produce un incremento significativo en ERO, que puede ser detectado por quimioluminiscencia con luminol. Este efecto se ve reducido con el extracto de frutos de *Eriobotrya japonica*, que se caracteriza por el contenido de carotenoides y vitaminas. La disminución de los radicales libres puede deberse al efecto antioxidante

del extracto debido a los componentes que presenta. Es así como los antioxidantes pueden ser empleados para prevenir la generación de ERO y minimizar el daño celular inducido por el estrés oxidativo. En esta investigación se ha estudiado el efecto de ARG, CIS, GLI y LEU sobre la producción de ERO en leucocitos promovida por el principio activo. Resulta interesante debido a que hay pocos reportes sobre el efecto de CLR al combinarse con antioxidantes.

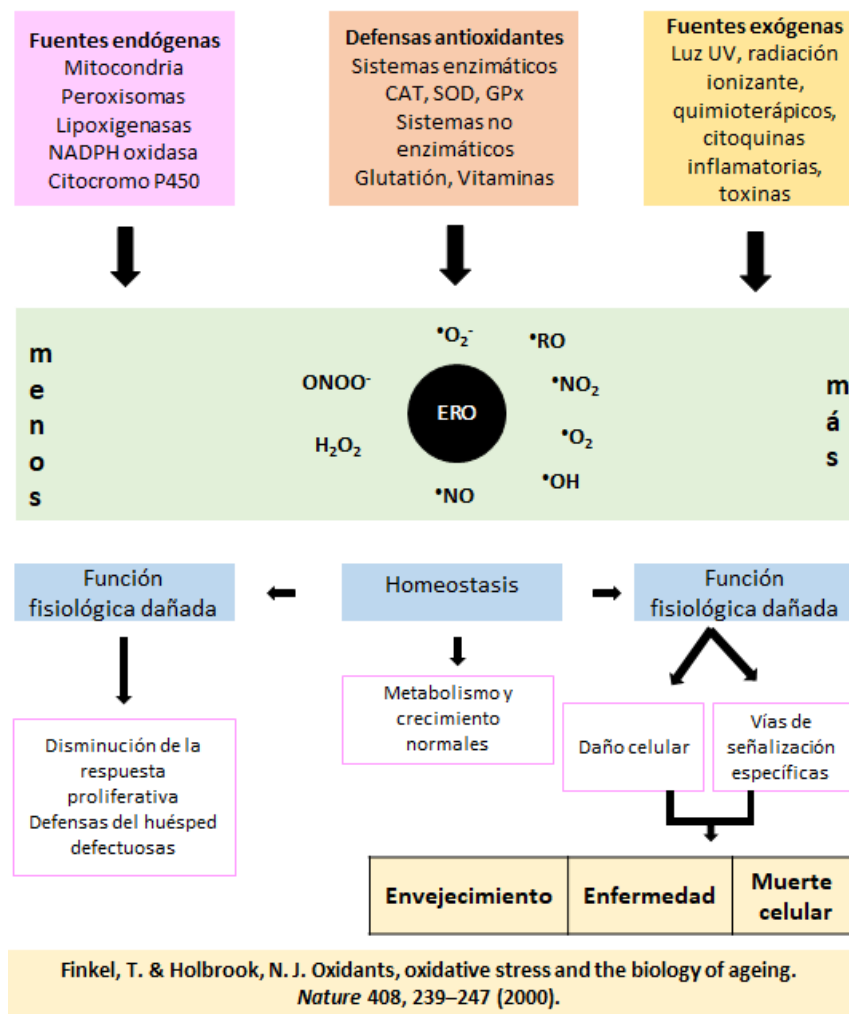


Figura 17. ERO, fuentes de producción y respuestas celulares.

Condiciones experimentales

Para el análisis de ERO, se tomaron muestras de sangre periférica humana a las 10 de la mañana del día del ensayo y fueron colocadas en jeringas de 20 ml con heparina. Los leucocitos fueron aislados mediante un proceso de sedimentación al combinarse con dextrano (Sigma, peso molecular 78000)/ Ficoll-Hypaque (Histopaque-1077, Sigma)⁵³.

La formación de ERO ha sido determinada por la formación del compuesto fluorescente rodamina-123 a partir de dihidrorodamina-123 (DHR-123). Este compuesto permea a través de la membrana celular y en el interior de la célula es oxidado por ERO para formar el derivado fluorescente.

Un volumen de 60 μ l de la suspensión de leucocitos fue incubado con 60 μ l de una solución de CLR (100 μ g/ml), su combinación binaria o buffer de Hanks (control); 60 μ l de buffer de Hanks y 20 μ l de DHR-123. La producción de ERO fue medida mediante la intensidad de fluorescencia generada (excitación, 480-20 nm; emisión, 580-20 nm; gain, 50) en un lector Bio Tek.

Estos ensayos fueron realizados en colaboración con la Dra. Virginia Aiassa de la unidad ejecutora UNITEFA (CONICET) y Facultad de Ciencias Químicas, UNC, Córdoba.

Análisis de resultados

Al analizar las combinaciones CLR:AA LIO se pudo observar que los niveles generados de ERO fueron significativamente menores que en las muestras tratadas con CLR puro (Figura 18), lo que sugiere que los aminoácidos han actuado como inhibidores o reductores de la generación de ERO.

Estos resultados han demostrado que las combinaciones de CLR con los aminoácidos estudiados presentan potencialidad para reducir los efectos tóxicos del principio activo sin afectar la actividad antimicrobiana, debido probablemente a las propiedades antioxidantes que presentan.

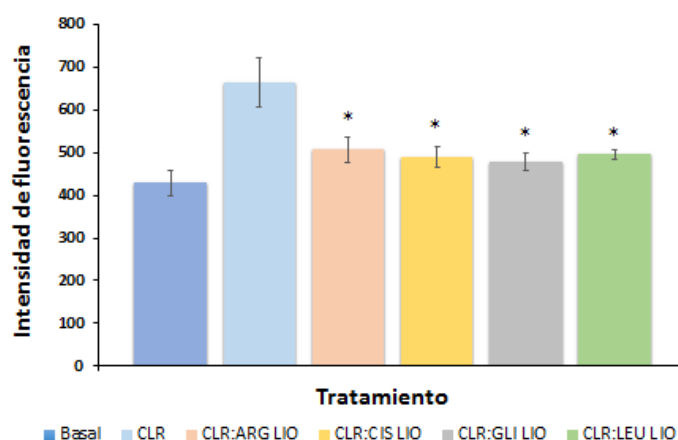


Figura 18. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno en leucocitos humanos por ensayo de fluorescencia. * $P < 0,05$ comparado a la muestra tratada con CLR.

*Hay diferencias significativas entre cada combinación y CLR puro ($p < 0,05$)

ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

Estabilidad es el grado en el que un compuesto o medicamento retiene, dentro de los límites especificados y durante todo su período de almacenamiento y utilización, las características originales⁶². El objetivo que persiguen los ensayos de estabilidad es proveer evidencia de cómo la calidad de una materia prima o producto terminado varía con el tiempo bajo determinadas condiciones¹¹².

La inestabilidad que puede tener lugar durante la síntesis del fármaco, su formulación y almacenamiento, puede conducir a la degradación y pérdida de potencia del principio activo, así como a la formación de nuevos compuestos con posibles efectos tóxicos¹¹².

Eficacia y seguridad son los atributos de calidad más importantes de un medicamento que se ven condicionados por la estabilidad física y química del principio activo contenido en la formulación¹¹³. También durante la combinación de fármacos con nuevos excipientes debe corroborarse que la mejora en el desempeño no esté acompañada de un detrimento en la calidad.

En los estudios de estabilidad, las muestras son colocadas en un envase adecuado y almacenadas bajo condiciones normales y aceleradas. A intervalos determinados, se estudia la potencia del producto mediante un método apropiado y se observa que no haya cambios físicos y químicos en el lapso de tiempo estudiado.

La estabilidad química hace referencia a la capacidad de un IFA de conservar su identidad química y potencia indicada dentro de los límites de las especificaciones, mientras que la estabilidad física refiere al mantenimiento de las propiedades físicas originales. En este caso, la estabilidad química fue evaluada de manera indirecta, a través de métodos de sensibilidad antimicrobiana, para determinar que la actividad del antibiótico no se ve modificada. La estabilidad física fue evaluada mediante RMNs y SEM, debido a lo relevante que resultaron estas técnicas para describir la morfología y el estado sólido de las muestras.

Condiciones experimentales

Las combinaciones CLR:AA LIO fueron almacenadas en recipientes de vidrio color ámbar, mantenidos bajo condiciones aceleradas de almacenamiento (40°C y 75% HR) y

analizadas luego de un mes (t_1). La estabilidad física fue determinada mediante RMNs y SEM para investigar posibles transformaciones sólidas. Por otro lado, también fue estudiada la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en placa descrito con anterioridad, frente a las especies *E. coli* y *S. aureus*.

Análisis de resultados:

RMNs: Como puede notarse en la Figura 19, en CLR:GLI LIO y CLR:LEU LIO no se observaron variaciones importantes luego de un mes de almacenamiento bajo las condiciones analizadas debido a que los espectros no presentan grandes modificaciones en los corrimientos de las señales y en el ancho de los picos.

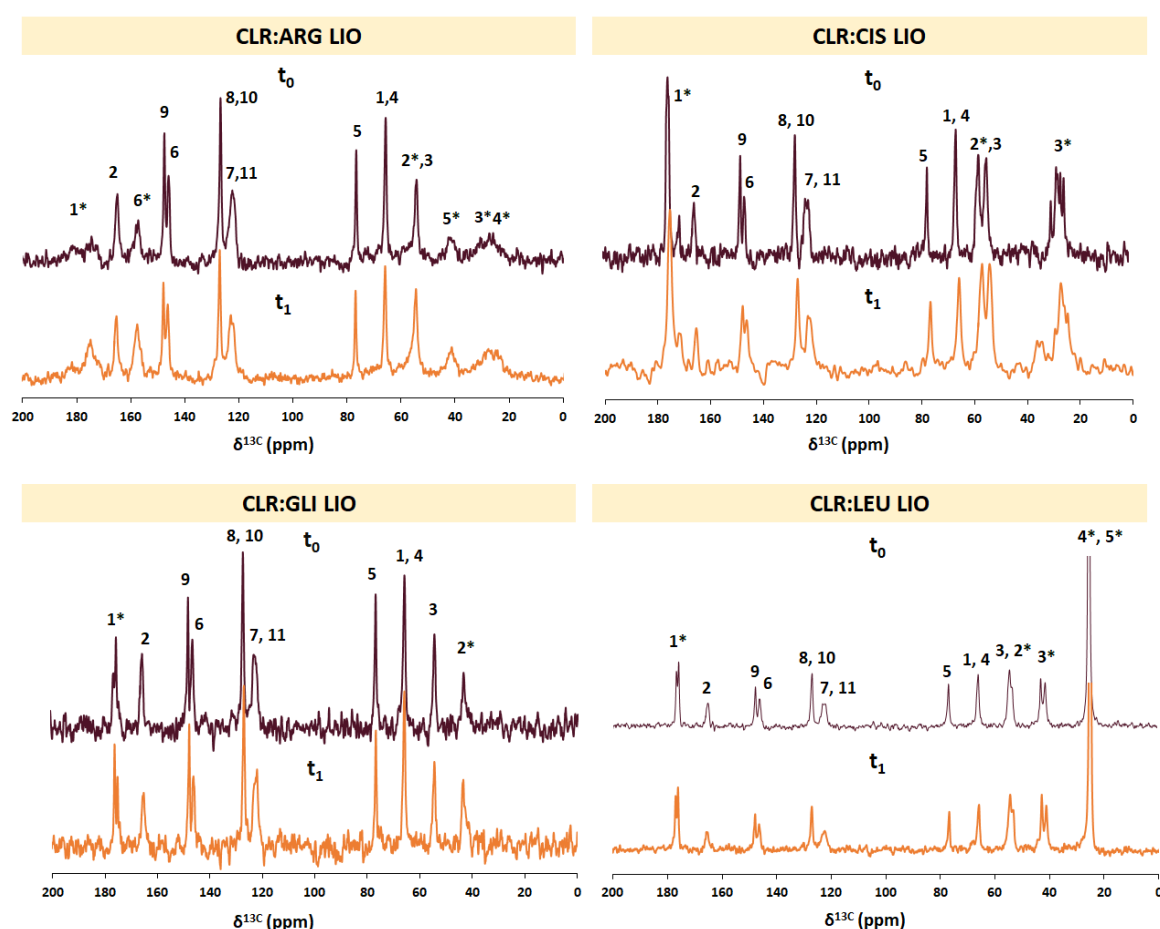


Figura 19. Espectros RMNs ^{13}C de las combinaciones CLR:AA LIO a t_0 y t_1 . Las señales del AA se distinguen con un asterisco.

En los espectros de CLR:CIS LIO no se perciben cambios importantes, excepto en la señal correspondiente al C1 del aminoácido. De la misma manera, para CLR:ARG LIO se evidenció una disminución en el ancho de las señales de ARG correspondientes a los carbonos C1, C3, C4 y C5, lo que demostró que el aminoácido cristaliza luego de un mes

de almacenamiento bajo las condiciones especificadas. Debe destacarse que las modificaciones en el grado de cristalinidad de los aminoácidos no afectaron las propiedades de las combinaciones sólidas. En ninguno de los espectros de los sistemas CLR:AA LIO estudiados hubo cambios en los corrimientos químicos de las señales del fármaco.

SEM: Las microfotografías presentadas en la Figura 20 revelan que la morfología de las partículas no ha cambiado luego del ensayo de estabilidad debido a que es posible observar las estructuras tubulares ahuecadas en los cristales obtenidos. El tamaño y el hábito cristalino se han mantenido, verificando que el fármaco es estable físicamente.

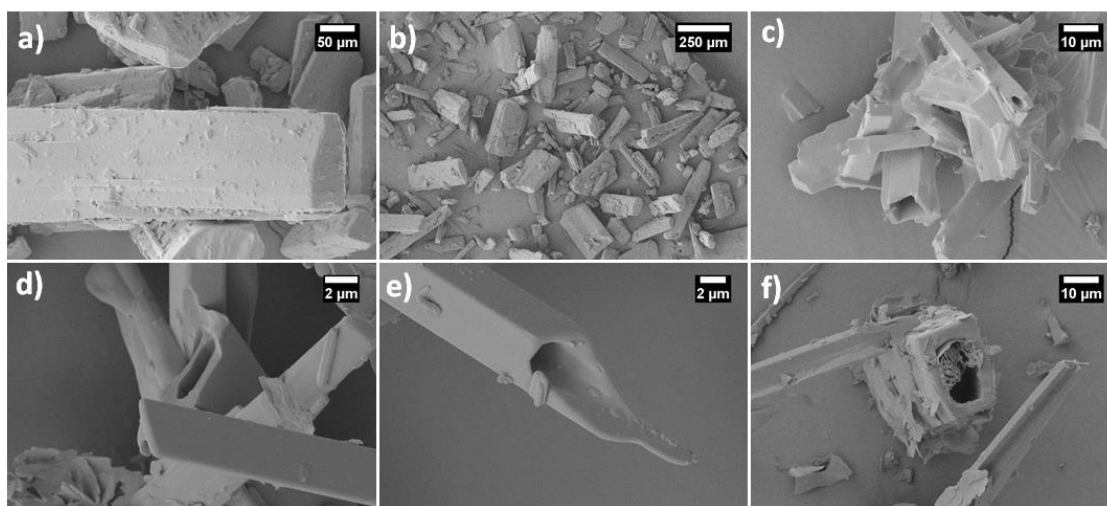


Figura 20. Microfotografías de CLR (a,b), CLR:ARG LIO (c), CLR:CIS LIO (d), CLR:GLI LIO (e) y CLR:LEU LIO (f) luego de 1 mes de ser mantenidos bajo condiciones aceleradas.

Actividad antimicrobiana: La actividad antimicrobiana de CLR (Tabla 4) no mostró diferencias estadísticamente significativas cuando las combinaciones fueron analizadas a T_0 , así como luego de haber sido mantenidas bajo las condiciones de almacenamiento especificadas. Estos resultados han permitido demostrar que no solo CLR ha conservado la estabilidad física sino además la actividad antibacteriana.

Tabla 4. Actividad antimicrobiana de CLR puro y de las combinaciones CLR:AA LIO a t_0 y t_1

Muestra	Halo de inhibición (mm) Promedio \pm DE			
	<i>S. aureus</i> 25923		<i>E. coli</i> 25922	
	t_0	t_1	t_0	t_1
CLR	27,5 \pm 0,5	28 \pm 1	30 \pm 1	31 \pm 1
CLR:ARG LIO	28,5 \pm 0,5	28 \pm 1	29,5 \pm 0,5	30,5 \pm 0,5
CLR:CIS LIO	27 \pm 1	28 \pm 1	31,5 \pm 0,5	32 \pm 1
CLR:GLI LIO	27,5 \pm 0,5	29 \pm 1	28,5 \pm 0,5	30 \pm 1
CLR:LEU LIO	27,5 \pm 0,5	28 \pm 1	28,5 \pm 0,5	30 \pm 1

A partir de los resultados obtenidos y dado a que en la combinación CLR:LEU LIO se mantuvo el grado de cristalinidad del aminoácido, éste fue el sistema binario seleccionado para continuar con los estudios de estabilidad.

Se evaluó la estabilidad de esta combinación al cabo de un año en condiciones normales de temperatura y humedad ambiente. La muestra se mantuvo en un frasco cerrado y protegida de la luz, y al finalizar el estudio de estabilidad fue analizada mediante SEM, RMNs y evaluación de la actividad antimicrobiana.

En el análisis mediante SEM se pudo observar que los cristales conservan la morfología y tamaño originales. Es posible distinguir las partículas de forma alargada y ahuecados en el interior como se aprecia en la Figura 21.



Figura 21. Microfotografías de CLR:LEU LIO luego de 12 meses de ser conservado en condiciones normales

Los espectros de RMNs obtenidos antes de iniciado el ensayo de estabilidad, al cabo de un mes y al año de ser mantenidos bajo las condiciones especificadas, se pueden

observar en la Figura 22. No hubo diferencias con respecto al corrimiento químico ni ensanchamiento de las señales de CLR y LEU. De esta manera se ha demostrado que la muestra mantiene su estabilidad física en el tiempo, ambos componentes conservan el grado de cristalinidad y continúa sin haber evidencias de que dichos compuestos interactúen entre sí.

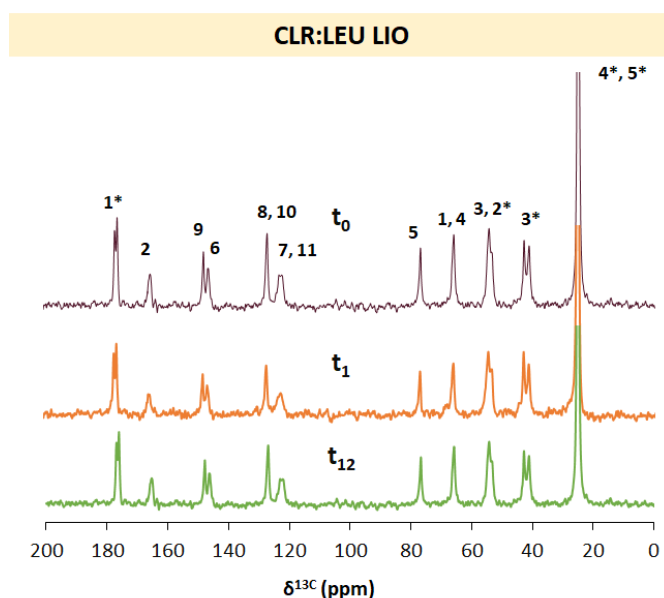


Figura 22. Espectros RMNs ^{13}C de CLR:LEU LIO a t_0 , t_1 (un mes en condiciones aceleradas) y t_{12} (12 meses en condiciones normales)

Con respecto a la actividad antimicrobiana del fármaco, no mostró diferencias con respecto a lo observado en los anteriores tiempos de análisis (t_0 y t_1), como puede verse en las Tablas 4 y 5.

Lo detallado previamente permite afirmar que CLR:LEU LIO ha presentado un mejor comportamiento de disolución que CLR puro, así como también ha logrado mantener la estabilidad física y la actividad microbiológica durante el ensayo.

Tabla 5. Actividad antimicrobiana de CLR puro y de CLR:LEU LIO a t_{12}

Muestra	Halo de inhibición (mm) Promedio \pm DE	
	<i>S. aureus</i> 25923	<i>E. coli</i> 25922
CLR	28,7 \pm 0,6	30,3 \pm 0,6
CLR:LEU LIO	29 \pm 1	30,3 \pm 0,6

CONCLUSIONES

El método de liofilización, utilizado en la obtención de las nuevas formas sólidas de CLR, es eficiente, amigable con el ambiente y de fácil escalado, esto último se desprende de la gran aplicación que presenta actualmente en la industria farmacéutica y alimentaria. Las combinaciones del IFA con los aminoácidos ARG, CIS, GLI y LEU han permitido disminuir la producción de ERO, uno de los motivos de toxicidad de este antibiótico que ha llevado a restringir su uso, a su vez, la actividad microbiológica de CLR se conserva en todas las combinaciones obtenidas frente a las especies estudiadas.

Otro aspecto relevante es que CLR continúa siendo cristalino luego de ser sometido a la liofilización, cuando este proceso de secado suele conducir a la obtención de compuestos amorfos, comprometiendo la estabilidad y propiedades fisicoquímicas originales. También debe destacarse que, a excepción de la combinación con ARG, el resto de los aminoácidos no demostraron interacción con el fármaco.

A partir de las nuevas formas sólidas se ha logrado mejorar el desempeño de disolución del IFA. Dicha mejora ha sido asociada al cambio en el hábito cristalino debido a que los cristales de CLR obtenidos por liofilizado presentaron una forma alargada, ahuecados en su interior y de menor tamaño, lo que contribuye al aumento de la superficie expuesta del sólido y permite que la disolución del principio activo sea más rápida. El grado de humectación de las muestras no resultó determinante en la mejora del perfil de disolución como pudo determinarse mediante la medición del ángulo de contacto.

La estabilidad física y la potencia microbiológica de CLR se vieron conservadas luego de que los sistemas sólidos se almacenaron durante un mes en condiciones aceleradas de temperatura y humedad. Sólo los aminoácidos ARG y CIS, que se amorfizaron luego del proceso de obtención, cristalizan con el tiempo, lo que puede comprometer la estabilidad y las propiedades originales de los sistemas sólidos.

La combinación CLR:LEU LIO resultó ser la más prometedora debido a que, junto con CLR:ARG LIO, presentaron los mejores perfiles de disolución comparados con el del principio activo. A diferencia de ARG, LEU conserva la cristalinidad original y su estructura sólida no se ve modificada en el tiempo. Desde el punto de vista

farmacéutico, esta combinación resulta la de elección para futuros estudios dirigidos a mejorar el desempeño del fármaco.

CAPÍTULO III

GLIBENCLAMIDA

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es un desorden metabólico caracterizado por hiperglucemia y un desbalance de carbohidratos, proteínas y lípidos¹¹⁴. Según la Federación Internacional de Diabetes (IDF) 1 de cada 11 adultos presentó esta patología en el 2015. La diabetes tipo II es la forma más frecuente de la enfermedad, es así que el 87 al 91% de los pacientes presentan esta variable¹¹⁵. La terapia farmacológica está basada en IFA hipoglucemiantes administrados por vía oral. La farmacoterapia juega un rol fundamental en el control de los niveles de glucosa en sangre y por ende en la prevención de complicaciones vasculares¹¹⁶.

Glibenclamida (GLB, pKa:5,3 , logP:3,79), una sulfonilurea de segunda generación (Figura 23), es uno de los agentes hipoglucemiantes orales más prescritos¹¹⁷. Actúa bloqueando los canales de potasio dependientes de ATP presentes en las células β -pancreáticas, lo que produce la despolarización de la membrana con la subsecuente entrada de Ca^{2+} y liberación de insulina¹¹⁸. Además, promueve el aumento de la sensibilidad a insulina en los tejidos periféricos que junto a la disminución de su aclaramiento hepático conduce a un aumento en los niveles de la hormona¹¹⁹.

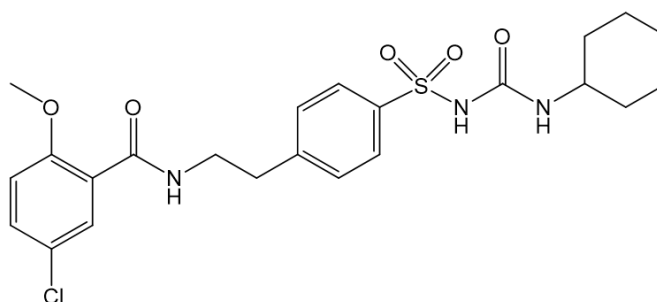


Figura 23. Estructura química de GLB

De acuerdo al sistema de clasificación biofarmacéutico, GLB pertenece a los IFA clase II, que se caracterizan por una buena permeabilidad intestinal y baja solubilidad acuosa³⁶. La solubilidad condiciona la velocidad de disolución de GLB en el tracto gastrointestinal y por lo tanto, es responsable de su baja y variable biodisponibilidad, así como también de problemas de bioequivalencia entre diferentes marcas¹¹⁷.

Diversas estrategias se han desarrollado en los últimos años con el objetivo de mejorar las propiedades de disolución de este IFA, como por ejemplo la amorfización

del fármaco³⁶, formación de complejos con ciclodextrinas¹²⁰, dispersiones sólidas¹²¹ y vehiculización en nanopartículas lipídicas¹¹⁷, no obstante, el problema de biodisponibilidad oral de GLB continúa vigente en la actualidad.

OBTENCIÓN DE LAS COMBINACIONES GLB:AA

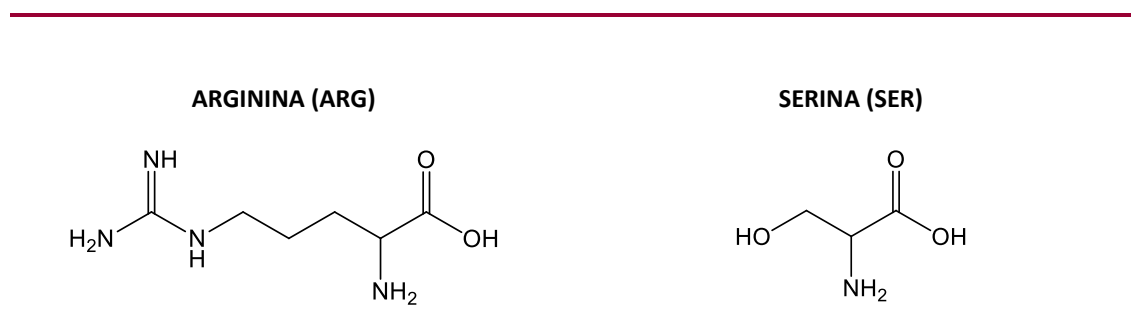
CONSIDERACIONES Y DESARROLLO EXPERIMENTAL

La mecanoquímica se define como la disciplina que promueve reacciones químicas a partir de la mezcla de reactivos en cualquier estado de agregación (líquidos y sólidos) inducidos por energía mecánica¹²²; se presenta como una alternativa de alto rendimiento que minimiza la utilización de solventes orgánicos. Los métodos mecanoquímicos incluyen desde el uso de un mortero con pilón hasta el empleo de molinos planetarios. En particular, la molienda asistida por solvente (MAS) surge como una opción diferente a los métodos tradicionales de cocrystalización que utilizan solventes orgánicos¹²³ y ha demostrado ser eficiente en la obtención de sistemas multicomponentes. Es importante tener en cuenta el tiempo y la frecuencia de la molienda debido a que modificaciones en estas variables pueden conducir a diferentes productos¹²⁴.

Para la obtención de las combinaciones, ARG fue uno de los aminoácidos seleccionados debido a que se ha demostrado que mejora la sensibilidad a insulina a nivel periférico y hepático en pacientes con diabetes tipo II^{125,126}. Por lo que la administración conjunta con el fármaco supone una ventaja, ya que GLB estimula la liberación de insulina, mientras que el aminoácido promueve el aprovechamiento.

Por otro lado, también se ha seleccionado a serina (SER) para la obtención de las combinaciones debido a que es uno de los aminoácidos presentes en el sitio receptor de sulfonilurea¹²⁷, se plantea como una posibilidad que esta interacción que se establece en el sistema biológico y que es responsable de la actividad farmacológica de GLB, también pueda tener lugar durante la obtención del sistema sólido³¹ y, de esta manera, lograr una nueva forma sólida del fármaco con propiedades superadoras. Las estructuras químicas de los aminoácidos se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Estructuras químicas de los AA utilizados para la obtención de sistemas sólidos GLB:AA



Las combinaciones fueron obtenidas a través de molienda asistida con solvente en una proporción 1:1 molar GLB:AA (donde AA corresponde a ARG o SER), ante el agregado de 0,25 µl de agua MilliQ por mg de sólido¹²³ y amasando en un mortero de ágata durante una hora. Posteriormente el sólido fue almacenado a temperatura ambiente en condiciones de vacío.

Como control del proceso de obtención, el fármaco puro también fue sometido a este procedimiento y además, se obtuvieron las mezclas físicas de los componentes, lo que implica la molienda durante cinco minutos sin agregado de solvente.

Cabe destacar que los rendimientos obtenidos mediante esta estrategia son elevados y, además de tener un bajo costo asociado, resulta amigable con el medio ambiente debido al máximo aprovechamiento de los materiales y a que no se utilizan solventes orgánicos durante el proceso de obtención.

También se intentaron obtener las combinaciones sólidas mediante liofilizado, pero debido a la baja solubilidad acuosa de GLB, el método resultó poco viable, sumado a esto, las cantidades de sólido obtenidas mediante esta estrategia fueron escasas por lo que la caracterización posterior de los sistemas binarios se vio dificultada. Asimismo, se probó obtener nuevas formas sólidas por evaporación lenta con solvente, usando pequeñas cantidades de etanol, sin mayor éxito.

Se utilizaron como materias primas GLB adquirida de Todo Droga (Argentina), ARG y SER de Sigma-Aldrich (USA) y el agua producida mediante un sistema purificador de agua Milli-Q (Millipore, USA).

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (IRTF)

Los fundamentos y utilidades de esta técnica ya han sido introducidos en el capítulo anterior. De la misma manera que para CLR, IRTF se ha utilizado con fines cualitativos, es decir, identificación de compuestos y evaluación de posibles interacciones entre los componentes de los sistemas sólidos desarrollados.

Condiciones experimentales

Los espectros fueron tomados en un espectrómetro Nicolet Avatar 360 FTIR bajo las mismas condiciones que se han detallado en el capítulo anterior.

Análisis de resultados

A partir del análisis del espectro de IRTF de GLB (Figura 24) y por comparación con el espectro encontrado en bibliografía^{36,128}, pudieron asignarse las bandas originadas a partir de las vibraciones de los principales grupos funcionales. Es así como a 3367 y 3315 cm^{-1} se encontraron las señales pertenecientes al NH de urea, además las señales observadas a 1614 y 1523 cm^{-1} fueron asociadas a los grupos CO y NH de urea. Por otro lado, el grupo CO de la amida fue responsable de la señal detectada a 1714 cm^{-1} y finalmente, las bandas exhibidas a 1340 y 1157 cm^{-1} fueron asociadas al grupo SO_2 .

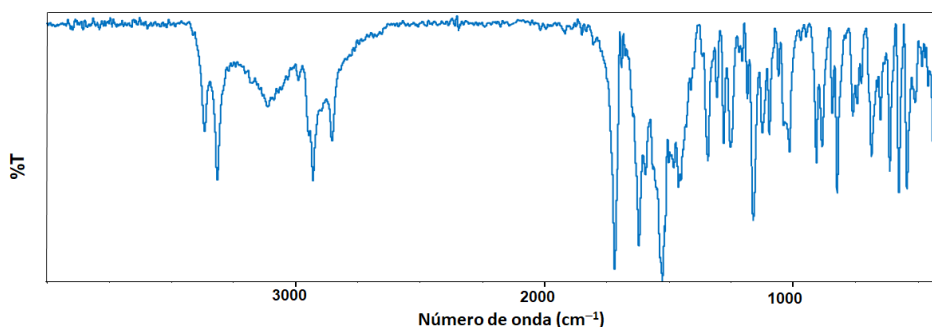


Figura 24. Espectro de IRTF de GLB

En el caso de ARG, como se ha mencionado en el capítulo anterior y analizado de acuerdo a la bibliografía consultada^{66,67}, se reconoció a 3068 cm^{-1} la señal originada por el grupo NH y a 2945 cm^{-1} por el CH_3 . A 1680 cm^{-1} y 1558 cm^{-1} fue posible distinguir las bandas correspondientes a las vibraciones de los grupos NH_2 y CO, respectivamente.

Por otro lado, SER ha presentado a 3467 cm^{-1} una señal originada por el grupo OH y a 3104 cm^{-1} por NH. A 2037 y 1467 cm^{-1} se identificaron las bandas de CH_2 , mientras que a 1600 y 1412 cm^{-1} las señales correspondientes a COOH. Todas las asignaciones resultaron acordes a lo encontrado en antecedentes sobre la caracterización fisicoquímica de este aminoácido^{129,130}.

En el caso de los espectros de las combinaciones GLB:AA obtenidas por mezcla física o mediante molienda asistida con solvente (Figura 25), las señales de los aminoácidos no pudieron ser identificadas por estar solapadas con las bandas del principio activo, que presentaron una mayor intensidad.

Los espectros de las mezclas físicas no presentaron mayores variaciones respecto a los espectros obtenidos mediante molienda asistida, las bandas del fármaco pudieron ser identificadas en todos los casos y no hubo cambios en la frecuencia a la que aparecen dichas bandas, por lo que se descarta la posibilidad de que haya interacciones entre el principio activo y los aminoácidos, o bien, no pudieron ser determinadas mediante esta técnica.

Todas las señales de GLB en las diferentes combinaciones se encuentran detalladas en el Anexo 3 para mayor información.

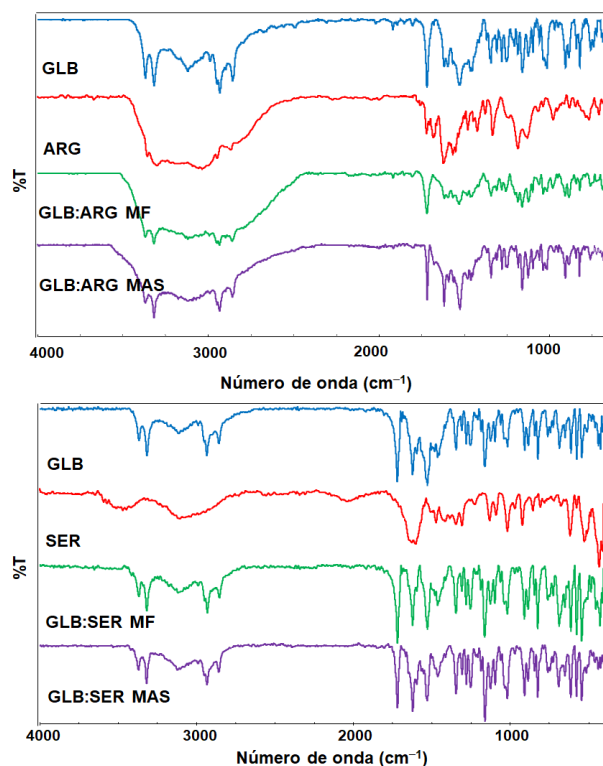


Figura 25. Espectros de IRTF de GLB, ARG, SER y las combinaciones GLB:AA

DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVOS (DRXP)

Como se describió previamente, la DRXP es una herramienta de suma utilidad que brinda información sobre la fase sólida de un determinado compuesto y, de hecho, se encuentra codificada en diferentes farmacopeas como técnica válida para la identificación de polimorfos³. A continuación se explican las condiciones experimentales y el análisis de los resultados obtenidos durante la caracterización de GLB y sus combinaciones con los aminoácidos.

Condiciones experimentales

Las mediciones fueron realizadas en un difractómetro PANalytical X-Pert Pro del Instituto de Investigaciones en Fisicoquímica de Córdoba (INFIQC) usando una radiación $\text{CuK}\alpha$, con 40 kV y 40 mA. Los difractogramas fueron tomados en el intervalo $5-40^\circ/2\theta$ con un tamaño de paso de $0,028^\circ$ y un tiempo de 24,9 s por paso.

Análisis de resultados

El difractograma de GLB (Figura 26) presentó los picos característicos del fármaco³⁶ en los ángulos $11,71$; $14,8$; $16,22$; 19 y $21^\circ 2\theta$.

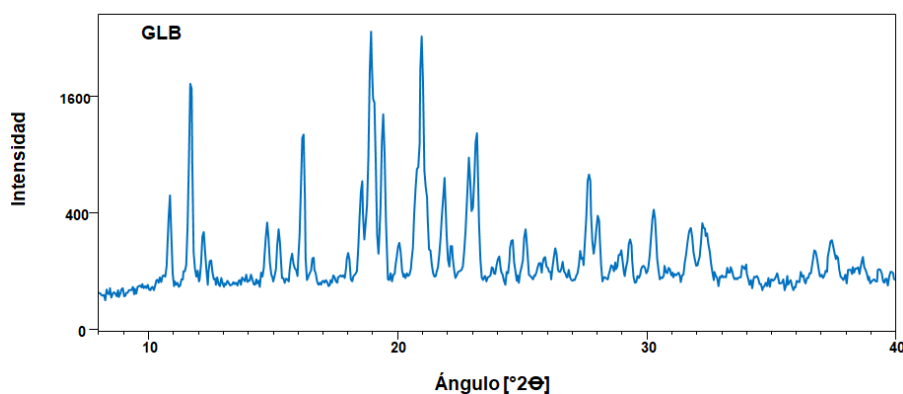


Figura 26. Patrón de difracción de GLB

Al observar los patrones de difracción de los componentes puros se confirmó que las sustancias de partida eran cristalinas. A su vez, también se pudo notar que luego de la molienda el grado de cristalinidad se conserva.

Los patrones de las mezclas físicas resultaron ser la superposición de los difractogramas de los componentes puros (Figura 27), es así como las señales de mayor intensidad de ARG pueden ser identificadas en el difractograma de GLB:ARG MF.

En el caso de GLB:SER MF se observó un pico característico del aminoácido a $22,7^{\circ} 2\theta$; luego de la molienda con el fármaco la intensidad de esta señal se redujo. Para corroborar que el aminoácido continuó siendo cristalino se recurrió a estudios de RMNs que serán detallados en una sección posterior.

En los difractogramas de los sistemas binarios (GLB:ARG MAS y GLB:SER MAS) no se observaron corrimientos en los principales picos ni aparición de nuevas señales. Se detectaron algunos picos ensanchados, lo que puede deberse a un cambio en el tamaño de las partículas, análisis que resulta acorde a lo esperado dado a que las combinaciones fueron obtenidas mediante un proceso de molienda.

Cabe destacar que las muestras continúan siendo cristalinas, condición que se terminará de confirmar mediante otras técnicas como RMNs y análisis térmico.

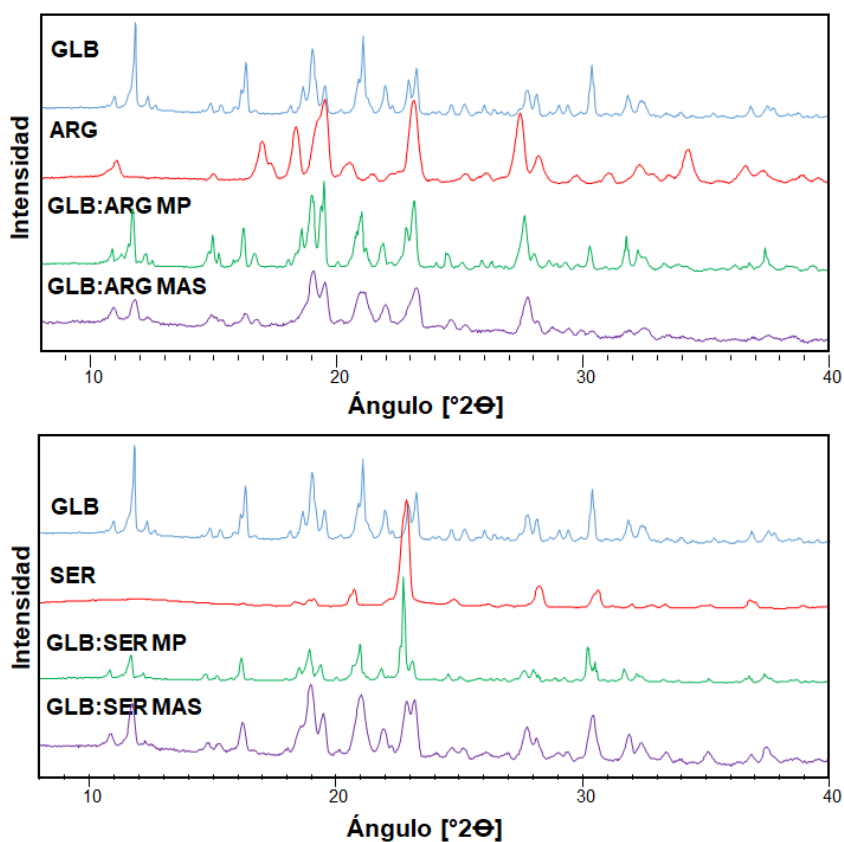


Figura 27. Difractogramas de GLB, AA y las combinaciones GLB:AA.

ANÁLISIS TÉRMICO

Las técnicas de análisis térmico son de utilidad en el estudio de las combinaciones GLB:AA MAS para obtener información sobre ciertas propiedades de las muestras, por ejemplo presencia de agua de hidratación, punto de fusión y degradación. En particular, el punto de fusión, es una propiedad que brinda mucha información de un sólido, es indicativo de la pureza, permite identificar un compuesto, incluso si los polimorfos de un principio activo se caracterizan por un punto de fusión diferente es posible distinguir entre ellos, así como establecer si los componentes de una formulación interactúan entre sí.

Condiciones experimentales

Los experimentos de DSC y TG fueron llevados a cabo en el equipamiento y bajo las condiciones que se han descrito para la caracterización de CLR y sus sistemas sólidos.

El análisis térmico ha sido importante para confirmar si las muestras sólidas obtenidas por combinación de GLB y los aminoácidos continúan siendo cristalinos, tal como los componentes de partida; además para evaluar la existencia de interacciones entre los componentes.

Análisis de resultados

Los resultados de GLB concordaron con la literatura¹³¹, se observó el punto de fusión a 175,8 °C, evento que se mantiene en el caso de GLB MAS (175,4°C), demostrando de esta manera que el proceso de molienda no afecta el estado sólido del fármaco. Además, para GLB:AA MF no se observaron cambios significativos (GLB:SER MF 174,6°C y GLB:ARG MF 173,7°C).

SER funde con degradación, de acuerdo a lo reportado en bibliografía¹³², la pérdida de masa comienza alrededor de 180°C como puede apreciarse por TG, mientras que a través de DSC no pudieron observarse los picos endotérmicos característicos debido a los parámetros utilizados en el ensayo. En el caso de GLB:SER MAS el punto de fusión disminuyó a 171,4°C.

Las muestras con ARG presentaron una endoterma de deshidratación por debajo de los 100°C, evento confirmado por la pérdida de peso en TG. Este proceso pudo

detectarse tanto en la MF como en el sistema obtenido mediante MAS. En este último caso, la entalpía de deshidratación es menor, debido a que luego del proceso de molienda, queda agua unida débilmente a la superficie del sólido que puede removerse con facilidad.

Al analizar la combinación GLB:ARG MAS, se observó que la fusión comenzó a temperaturas menores al punto de fusión del compuesto puro (pico a 159°C) y el rango, a su vez, se vio incrementado, indicando que existe algún tipo de interacción entre los componentes.

En todos los sistemas binarios, la degradación comenzó después de la fusión. Los termogramas obtenidos por DSC y TG pueden observarse en la Figura 28.

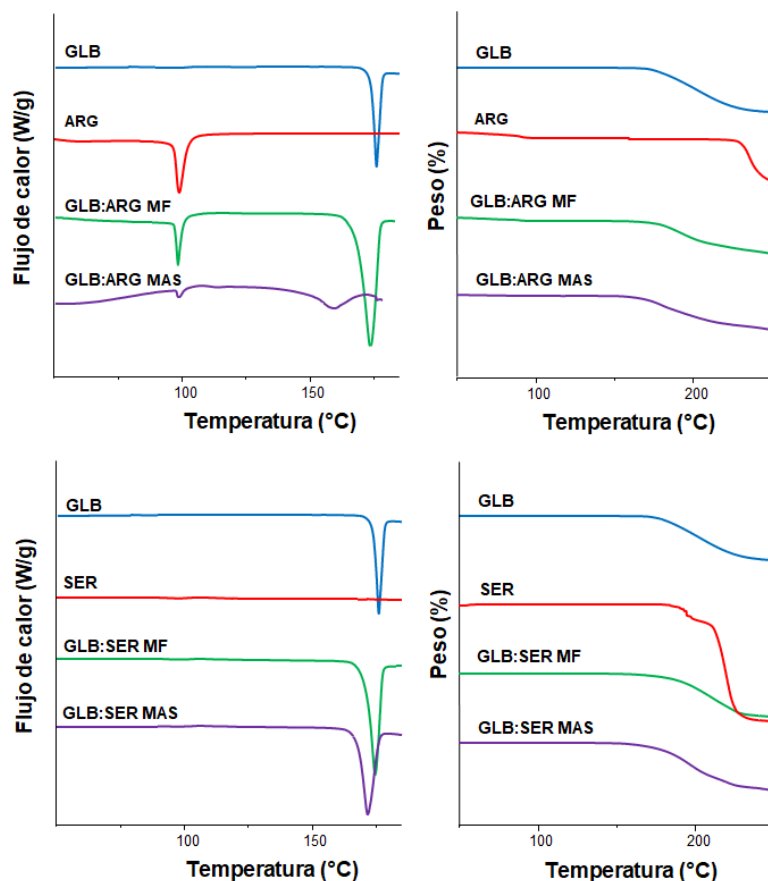


Figura 28. Termogramas de DSC (izquierda) y TG (derecha) de GLB y las combinaciones GLB:AA MAS y GLB:AA MF

ANGULO DE CONTACTO

La asociación de fármacos con aminoácidos ha demostrado, en algunas oportunidades, incrementar la humectabilidad del sólido, tal como ha sucedido en la combinación de ARG con simvastatina y atorvastatina⁸¹, donde la presencia del aminoácido en altas proporciones ha reducido el ángulo de contacto determinado mediante el método de la gota sésil. Por lo que resulta interesante evaluar el comportamiento de las combinaciones sólidas de GLB mediante esta técnica.

Condiciones experimentales

Las mediciones del ángulo de contacto fueron llevadas a cabo bajo las mismas condiciones y en el goniómetro descrito en el capítulo 2. Las muestras en polvo fueron colocadas, mediante el uso de una cinta doble faz, sobre un portaobjeto y se alisó la superficie con la punta de una espátula para asegurar que la porción expuesta sea llana y con la mínima rugosidad posible.

Análisis de resultados

Las fotografías que se muestran en la Figura 29, fueron obtenidas del video luego de transcurrir 30 s desde que se arrojó la gota sobre la muestra. Si bien tanto ARG como SER son aminoácidos con propiedades hidrófilas^{30,132}, el comportamiento de las combinaciones obtenidas fue diferente.

GLB presentó un ángulo de $130,9 \pm 0,4^\circ$, GLB:SER MAS $136 \pm 6^\circ$ y para GLB:SER MF el valor obtenido fue de $137 \pm 4^\circ$, por lo que puede decirse que el grado de humectación del sólido no fue modificado en gran medida ante estas combinaciones sólidas y debido a que los valores son mayores a 90° presentaron características hidrófobas. Los ángulos permanecieron constantes con el paso del tiempo, es decir la humectación del sólido no se modificó.

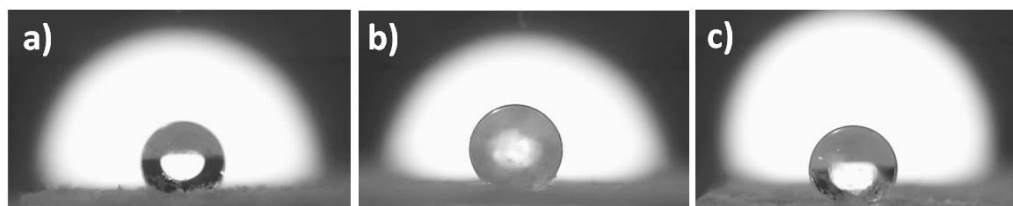


Figura 29. Fotografías obtenidas durante la determinación del ángulo de contacto a los 30 segundos de arrojada la gota a) GLB, b) GLB:SER MAS y c) GLB:SER MF

Por otro lado, en el caso de las combinaciones con ARG, se pudo observar que tanto para GLB:ARG MAS como para GLB:ARG MF, el ángulo de contacto se redujo por debajo de los 90°, por lo que estas combinaciones se caracterizaron como hidrófilas, lo que indicó que la presencia de ARG mejora la humectabilidad del fármaco, independientemente del método de obtención.

Debe destacarse, como puede observarse en la Figura 30, que la humectación del sólido fue más rápida en la combinación obtenida mediante molienda; de hecho en el caso de GLB:ARG MF pudo calcularse un valor de ángulo inicial de $122 \pm 7^\circ$ pero luego de 15 s desde que la gota fue arrojada este valor disminuyó por debajo de los 90°. En la combinación GLB:ARG MAS la gota se esparce de forma inmediata.

A partir del análisis anterior puede decirse que existe la probabilidad de que las combinaciones que contengan ARG presenten una mejorada velocidad de disolución, no obstante, para poder afirmar esto, se realizaron estudios de disolución que son detallados en puntos posteriores. Cabe recordar que, en el caso de las combinaciones con CLR, descritas en el capítulo I, el ángulo de contacto no fue determinante en el comportamiento de disolución observado.

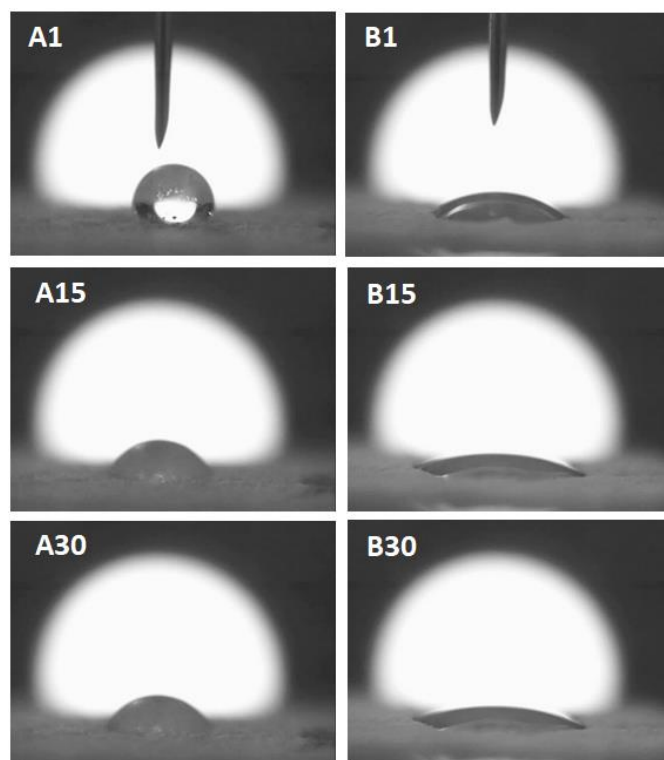


Figura 30. Fotografía obtenidas durante la determinación del ángulo de contacto para GLB:ARG MF (A) y GLB:ARG MAS (B) a los 1s, 15s y 30s de arrojar la gota

MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRÓNICO (SEM)

En el análisis de las nuevas formas sólidas de CLR, obtenidas en presencia de aminoácidos, la SEM resultó ser una de las principales herramientas de caracterización debido a la peculiar morfología que presentaron las partículas de los sistemas obtenidos. En el caso de las combinaciones obtenidas con GLB, esta técnica permite complementar la caracterización fisicoquímica, analizar el tamaño de las partículas y las propiedades de superficie de los sólidos.

Condiciones experimentales

Las muestras fueron analizadas en el microscopio que se ha descrito en el capítulo anterior y el tratamiento de las muestras, previo al análisis, se realizó de igual manera que para las muestras de CLR.

Análisis de resultados

Como se puede apreciar en la Figura 31, las partículas del fármaco sin procesar presentaron una forma prismática cuadrangular, superficie lisa y midieron de 30 a 200 μm . En GLB:ARG MAS, como era de esperarse, se logró reducir el tamaño de partícula debido al proceso de molienda y se observaron aglomerados de 2 a 50 μm de partículas más pequeñas, la forma original de las partículas también se modificó y se presentaron con un aspecto irregular, a diferencia de la superficie lisa que caracterizó a la mayoría de las partículas de GLB sin procesar. En el caso de GLB:SER MAS, similar a lo que sucedió en la combinación con ARG mediante molienda asistida por solvente, se obtuvieron aglomerados de 10 a 80 μm de partículas más pequeñas.

La formación de aglomerados se debe a que, al reducir el tamaño de partícula mediante un método de molienda, las partículas resultantes se encuentran cargadas electrostáticamente y para estabilizarse tienden a agruparse^{133,134}, razón por la que no fue posible observar partículas aisladas en las microfotografías. Debe corroborarse que este comportamiento no afecte la estabilidad física y química del fármaco, aunque las

propiedades a granel son las que suelen verse afectadas en mayor medida a partir de la obtención de sólidos con estas características.

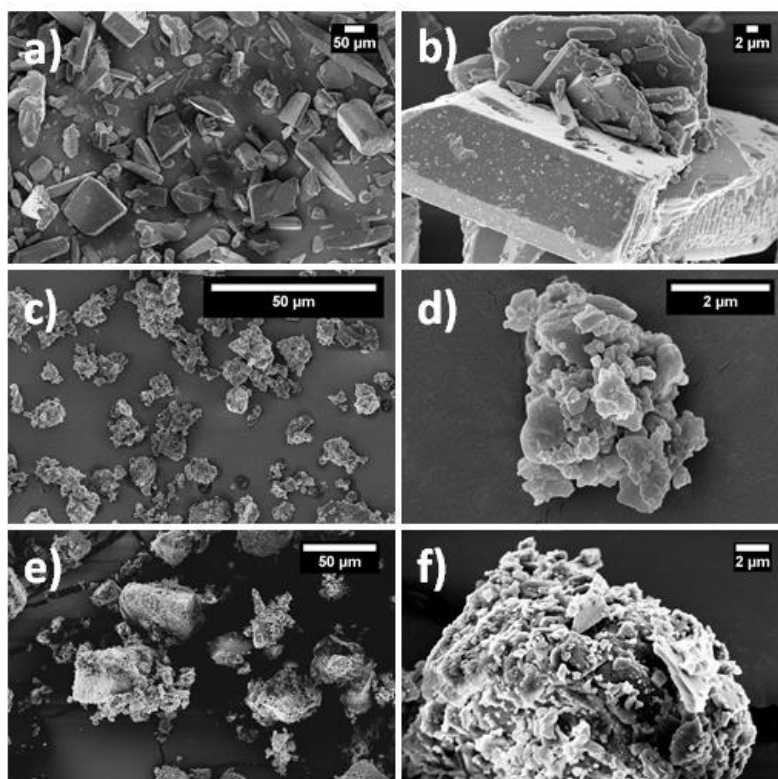


Figura 31. Microfotografías de GLB (a y b), GLB:ARG MAS (c y d) y GLB:SER MAS (e y f)

Por otro lado, con el detector EDS (Energy Dispersive Spectroscopy, espectroscopia de energía dispersiva) fue posible efectuar un análisis elemental, ya que permite analizar los rayos X emitidos, producto de la interacción del haz electrónico con la muestra. Este tipo de ensayos se utilizó debido a que GLB presenta Cl y S en su estructura y los aminoácidos no, por lo tanto permitió visualizar la distribución de estos elementos en la muestra y, por ende, la distribución de GLB, constituye una medida del grado de homogeneidad de la muestra. Este estudio resultó de utilidad debido a que el proceso de molienda manual es poco controlado y no siempre conduce a muestras con alto grado de homogeneidad. Al analizar las imágenes obtenidas en detalle (Figura 32), no se observaron áreas sin Cl o S, por lo que se puede postular que mediante molienda asistida con solvente se lograron muestras uniformes.

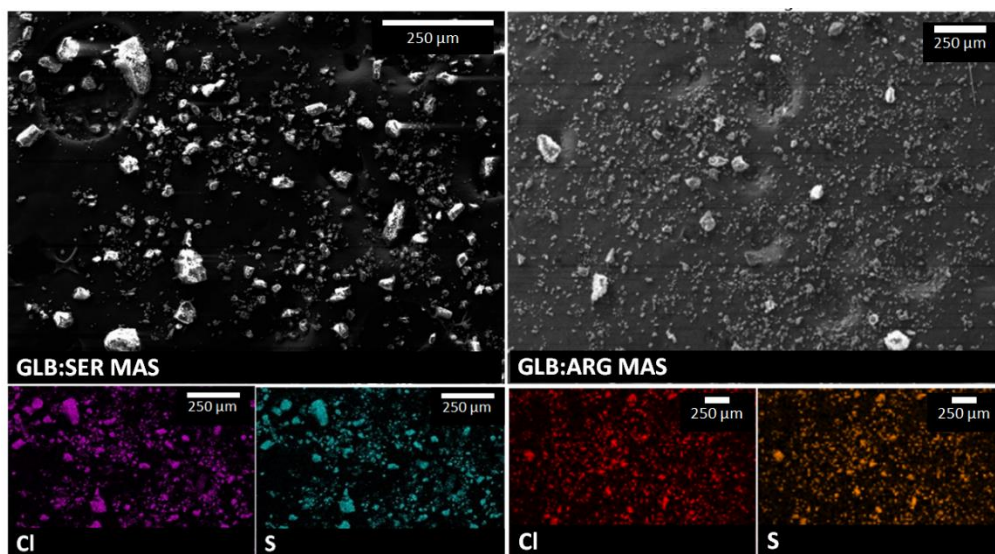


Figura 32. Imágenes obtenidas con el detector EDS de GLB:SER MAS (izquierda) y GLB:ARG MAS (derecha) y la distribución de Cl y S

A diferencia de las muestras obtenidas por molienda asistida con solvente, en las mezclas físicas de los componentes fue posible observar zonas donde no se encontraron partículas del fármaco. En la Figura 33 se muestran las imágenes obtenidas con el detector EDS de GLB:SER MF y GLB:ARG MF, en las que se pudieron identificar partículas pertenecientes a ambos compuestos.

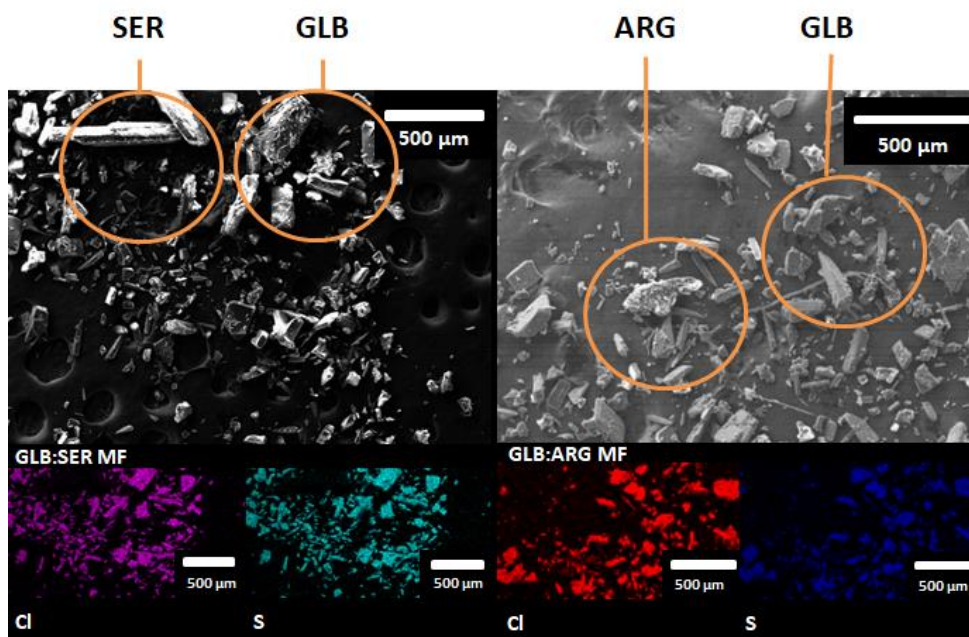


Figura 33. Imágenes obtenidas con el detector EDS de GLB:SER MF (izquierda) y GLB:ARG MF (derecha) y la distribución de Cl y S

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ESTADO SÓLIDO (RMNs)

Se recurrió a esta técnica con el propósito de dilucidar la estructura del fármaco y los aminoácidos, así como establecer la existencia de interacciones entre los componentes de las combinaciones que tal vez no hayan podido detectarse mediante las demás técnicas de caracterización utilizadas.

Condiciones experimentales:

Los espectros de ^{13}C de RMNs de alta resolución han sido obtenidos utilizando una polarización cruzada con rotación al ángulo mágico (CP-MAS) tal como se realizó en la caracterización de estado sólido de CLR y sus combinaciones. Los experimentos se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance II a 300,13 MHz a temperatura ambiente utilizando glicina como referencia externa. El tiempo de relajación fue de 20 ms y el tiempo de contacto de 2 ms; la velocidad de rotación para todas las muestras estudiadas fue de 10 kHz.

Análisis de resultados:

Los espectros de los componentes puros se observan en las Figura 34 y resultaron acordes a la bibliografía consultada^{131,135}. En la combinación con SER mediante molienda asistida con solvente, tanto las señales del aminoácido como de GLB no presentaron modificaciones con respecto a la mezcla física de los componentes, que resultó ser la sumatoria de los espectros de los componentes individuales. Sólo es posible mencionar una leve reducción en la intensidad de las señales de SER luego de la molienda. A partir de estos resultados se pudo establecer que no hay interacciones entre los componentes ni modificaciones en la estructura interna.

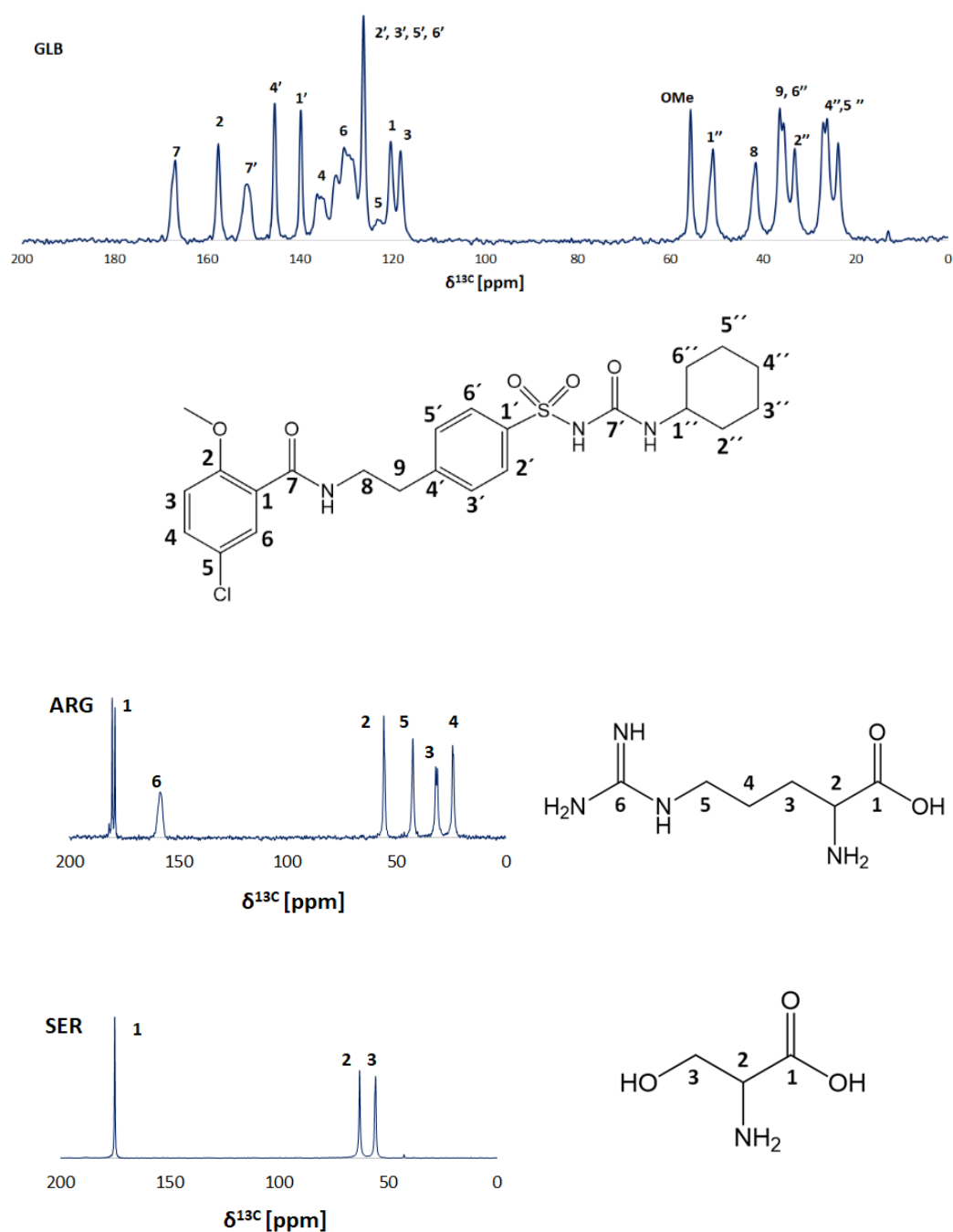


Figura 34. Espectros con asignación de señales y estructuras químicas de GLB, ARG y SER

El espectro RMNs de ^{13}C de ARG presentó la señal correspondiente al carbonilo del grupo ácido C1 desdoblada (180 ppm), así como las dos señales que aparecen a baja frecuencia de C3 y C4 (24 y 32 ppm), de acuerdo a la existencia de más de una molécula de ARG por celda unitaria como se ha reportado en bibliografía¹³⁵. Esta multiplicidad no

se observa en las señales de 56 y 43 ppm debido a que el entorno químico de estos sitios en las moléculas no equivalentes es probablemente muy similar.

En el caso de las combinaciones con ARG, se observó que en el espectro de GLB:ARG MF se mantiene la multiplicidad de las señales correspondientes al aminoácido, lo que puede observarse en la señal de 180 ppm que se presenta desdoblada tal como sucede en el espectro de ARG pura. Mientras que en GLB:ARG MAS dicha señal presentó un único pico poniendo en evidencia que el arreglo molecular de ARG ha sido modificado, en las señales de GLB no se observaron mayores modificaciones.

En la Figura 35 se presentan los espectros de las combinaciones GLB:AA y en el Anexo 4 las tablas con los corrimientos químicos detallados para mayor información.

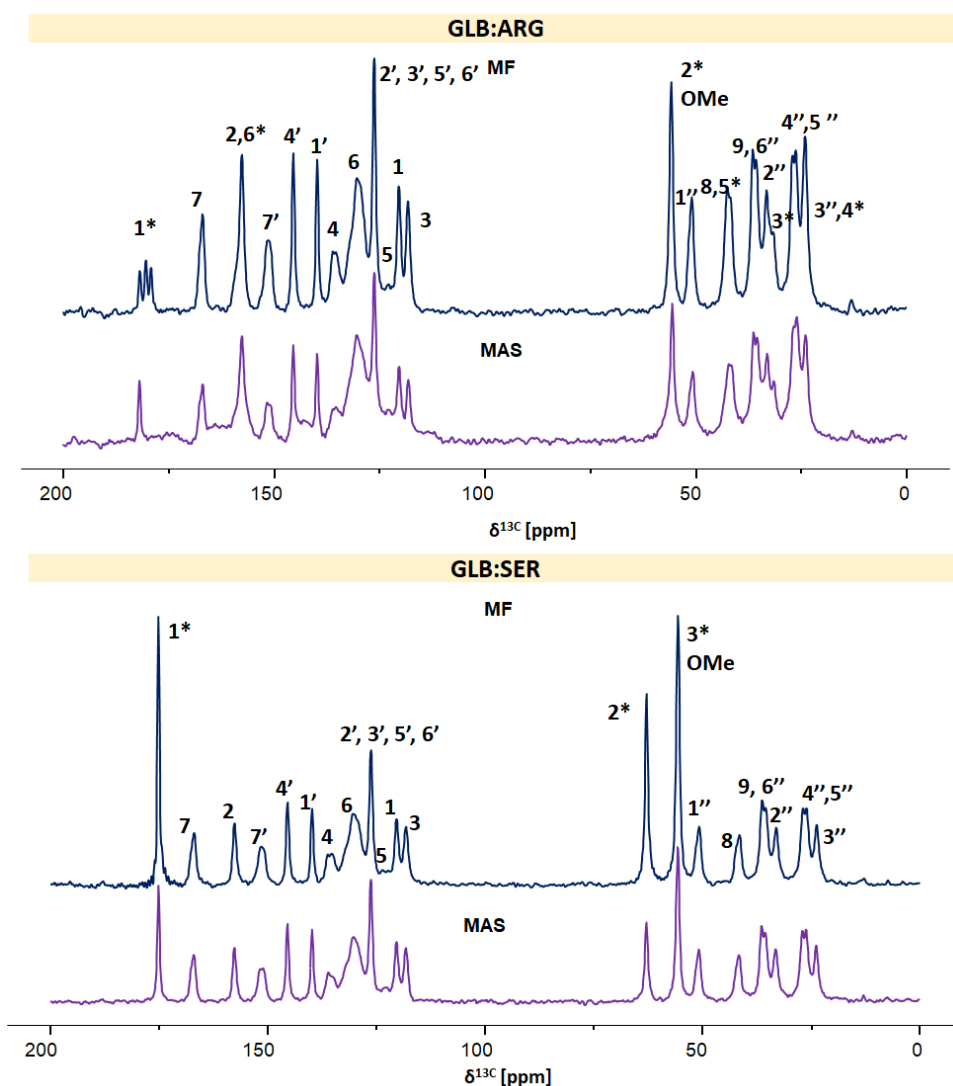


Figura 35. Espectros de RMNs de las combinaciones GLB:AA MF y GLB:AA MAS (Las señales de los aminoácidos son identificadas con un asterisco)

ENSAYO DE DISOLUCIÓN

Si bien los ensayos de disolución se encuentran codificados en farmacopeas como método de control de calidad de formulaciones sólidas, en el presente trabajo se utilizan para evaluar el desempeño de las combinaciones sólidas obtenidas, se trata de un ensayo preliminar, que muchas veces suele subestimarse por ser *in vitro*, pero en la práctica sirve como premisa del comportamiento de un determinado sólido farmacéutico.

Condiciones experimentales

Los estudios se realizaron en un disolutor (Hanson SR11 6 Flask Dissolution Test Station, Hanson Research Corporation, Chatsworth, USA) con el método de paletas de acuerdo a lo establecido en la USP. Los estudios fueron llevados a cabo con 5 mg de GLB o una cantidad equivalente de GLB:AA en 500 ml de buffer fosfato (pH 7,4) mantenido a $37,0 \pm 0,3$ °C y agitando a 50 RPM durante 120 minutos¹³⁶. Alícuotas de 2 ml fueron tomadas periódicamente y reemplazadas con medio fresco mantenido a la misma temperatura. Luego de filtrar las muestras a través de membranas de 0,45 μ m (Millipore, USA), las concentraciones de las muestras fueron determinadas espectrofotométricamente (Espectrofotómetro Shimadzu UV-Mini 1240) a 229 nm a partir de la construcción de una curva de calibración:

$$y = 22763,03 M^{-1}x + 0,0121 \quad r^2 = 0,997$$

Para comparar los perfiles se calcularon los factores f_1 y f_2 de acuerdo a las ecuaciones 1 y 2 descriptas en el capítulo anterior.

Análisis de resultados

Los perfiles de disolución obtenidos pueden observarse en la Figura 37 para mayor detalle. El porcentaje de fármaco puro disuelto obtenido al cabo de 120 min fue de 9 ± 1 %, mientras que los valores obtenidos para GLB:SER MAS, GLB:SER MF, GLB:ARG MAS y GLB:ARG MF fueron de $36,7 \pm 0,6$; 11 ± 4 ; 85 ± 2 y 9 ± 1 respectivamente.

En cuanto a los factores calculados para comparar el perfil del fármaco sin procesar con las curvas de las combinaciones sólidas pueden visualizarse en la Tabla 7. Debe

recordarse que, para que los perfiles se consideren similares, f_1 debe encontrarse entre 0-15, en esta oportunidad todas las combinaciones difieren de GLB pura debido a que los valores no están incluidos en dicho intervalo. Sin embargo, al evaluar el factor f_2 , que considera que las curvas son equivalentes si el valor está comprendido entre 50-100, se establece que los perfiles de las MF y el perfil de GLB son similares, mientras que las combinaciones obtenidas mediante MAS, tal como puede observarse en la Figura 36, difieren notablemente del comportamiento del fármaco puro.

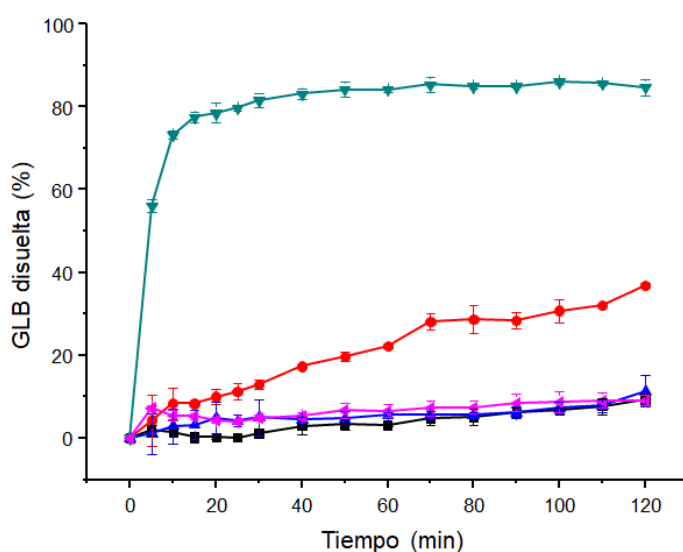


Figura 36. Perfiles de disolución obtenidos para •GLB, •GLB:ARG MF, ΔGLB:ARG MAS, ΔGLB:SER MF y •GLB:SER MAS

Tabla 7. Valores de f_1 y f_2 obtenidos para las combinaciones GLB:AA MAS con respecto a GLB

	f_1	f_2
GLB:ARG MAS/ GLB	96	6
GLB:ARG MF/ GLB	46	73
GLB:SER MAS/ GLB	82	37
GLB:SER MF/ GLB	35	70

La mejora en el desempeño de disolución puede estar asociada a la reducción en el tamaño de partícula, que en el caso de GLB:SER MAS constituye el factor determinante, debido a que no se encontraron interacciones entre los componentes, por ende no se

ha obtenido una nueva forma sólida, a la vez que el grado de humectación del sólido no se vio mejorado.

Por otro lado, al hablar de GLB:ARG MAS, debe tenerse en cuenta que se obtuvieron partículas de menor tamaño que en la combinación GLB:SER MAS. También se observó mediante DRXP, DSC, TG y RMNs un comportamiento diferente al de las MF, por lo que se sugiere la existencia de interacciones y la obtención de un sistema binario donde se conserva el grado de cristalinidad de los componentes de partida. Finalmente, la reducción en el ángulo de contacto, ha permitido aseverar que la humectabilidad del sólido se vio incrementada, de hecho, la dispersión de la gota observada durante el ensayo es inmediata. En conjunto todos estos factores contribuyen en diferente grado a que la velocidad de disolución del fármaco sea mayor.

ENSAYO DE ESTABILIDAD

Como consecuencia del estrés mecánico de la molienda se suelen producir cambios en la superficie de las partículas obtenidas, así como pérdida en el grado de cristalinidad de los compuestos, fenómeno que se ha visualizado en fármacos como griseofulvina¹³⁷ y que ha permitido mejorar el desempeño de disolución. Las propiedades de flujo y mezclado también pueden verse afectadas, así como la estabilidad de los sólidos obtenidos¹³³. Por estos motivos es importante realizar un estudio cuidadoso del estado sólido a lo largo del tiempo, sobre todo si los sistemas han sido expuestos a rigurosos procesos de molienda.

Condiciones experimentales:

Las muestras fueron colocadas en frascos de color ámbar, cerrados y mantenidos bajo condiciones aceleradas de almacenamiento (40°C y 75% HR) durante seis meses. La estabilidad física fue evaluada mediante DRXP y análisis térmico, mientras que la estabilidad química a través de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Método de HPLC: Las mediciones fueron realizadas en un cromatógrafo Agilent Series 1100 con un detector uv-vis seteado a 229 nm, la temperatura se mantuvo a 25°C y fue utilizada una columna de fase reversa C18 Phenomenex® (4,6 mm x 250 mm y 5 µm de tamaño de partícula) con una precolumna. La fase móvil fue preparada en una proporción de 55% v/v de acetonitrilo y 45% v/v de buffer fosfato monobásico de amonio (0,05 M), desgasificada y filtrada mediante una membrana Millipore (poro de 0,45 µm). Las muestras se disolvieron y diluyeron en la fase móvil y fueron corridas con un flujo de 1,5 ml/min, mostrando un tiempo de retención de 7,6 min, el cromatograma de GLB puede observarse en la Figura 37.

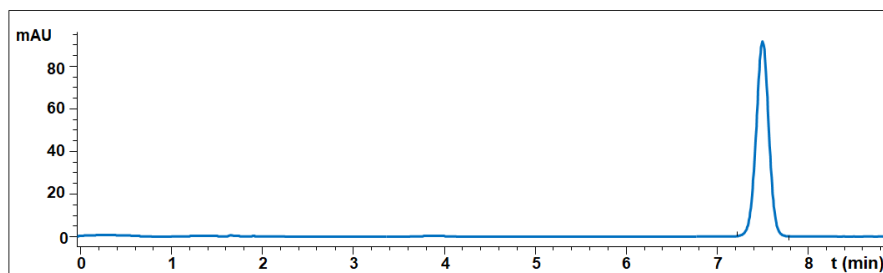


Figura 37. Cromatograma de GLB (Concentración 20 µg/ml) obtenido bajo las condiciones especificadas

El ensayo fue lineal ($r^2=0,99$) en el rango de concentraciones utilizadas (8-24 $\mu\text{g/mL}$), además la exactitud y precisión fueron determinadas al 80, 100 y 120% de la concentración nominal (20 $\mu\text{g/mL}$). El porcentaje de recuperación promedio resultó 100,02% y la desviación estándar relativa fue menor al 2% en todos los casos, demostrando que el método es exacto y preciso bajo las condiciones ensayadas.

Para evaluar la especificidad del método en presencia de potenciales impurezas que puedan producirse durante el estudio de estabilidad, se realizaron estudios de degradación forzada. Se sometió a las muestras a condiciones de estrés con el fin de obtener el perfil de los productos de degradación y establecer si dicha presencia interfiere o no con la determinación del analito. Se disolvió el fármaco y fue sometido a condiciones ácidas, básicas, térmicas y oxidativas forzadas.

Como se muestra en la Tabla 8, en todos los casos, los productos de degradación presentaron un menor tiempo de retención que GLB, cuya señal se encontró bien resuelta y puede distinguirse con facilidad. A partir de este ensayo es posible afirmar que el método analítico es específico para la evaluación del principio activo en presencia de potenciales productos de degradación.

Tabla 8. Estudios de degradación forzada. Concentración de GLB, porcentaje de degradación con respecto a la concentración inicial (20,5 $\mu\text{g/mL}$) y número de productos de degradación el tiempo de retención correspondiente.

Condición del estrés	Concentración GLB ($\mu\text{g/mL}$)	% Degradación	Número de productos de degradación (Tr)
ÁCIDO	10,1 \pm 0,5	51	2 (1,1; 3,5)
BÁSICO	15 \pm 2	27	2 (1,1; 1,6)
TÉRMICO	18,5 \pm 0,3	10	1 (3,5)
OXIDATIVO	11 \pm 2	45	2 (1,8; 2)

Análisis de resultados

Se ha establecido como cambio significativo de la estabilidad química de un compuesto cuando la concentración del fármaco decae en un 5% comparado con el tiempo inicial³, llamado tiempo cero (t_0). Como se puede observar en la Figura 38, el contenido de GLB en GLB:ARG MAS descendió a 97 ± 1 % después de los seis meses de

almacenamiento (t_6) y en el sistema GLB:SER MAS a $99,3 \pm 0,7$ % comprobando de esta manera que las combinaciones sólidas con aminoácidos, que mejoraron el desempeño de disolución del IFA, no comprometen la estabilidad química de GLB.

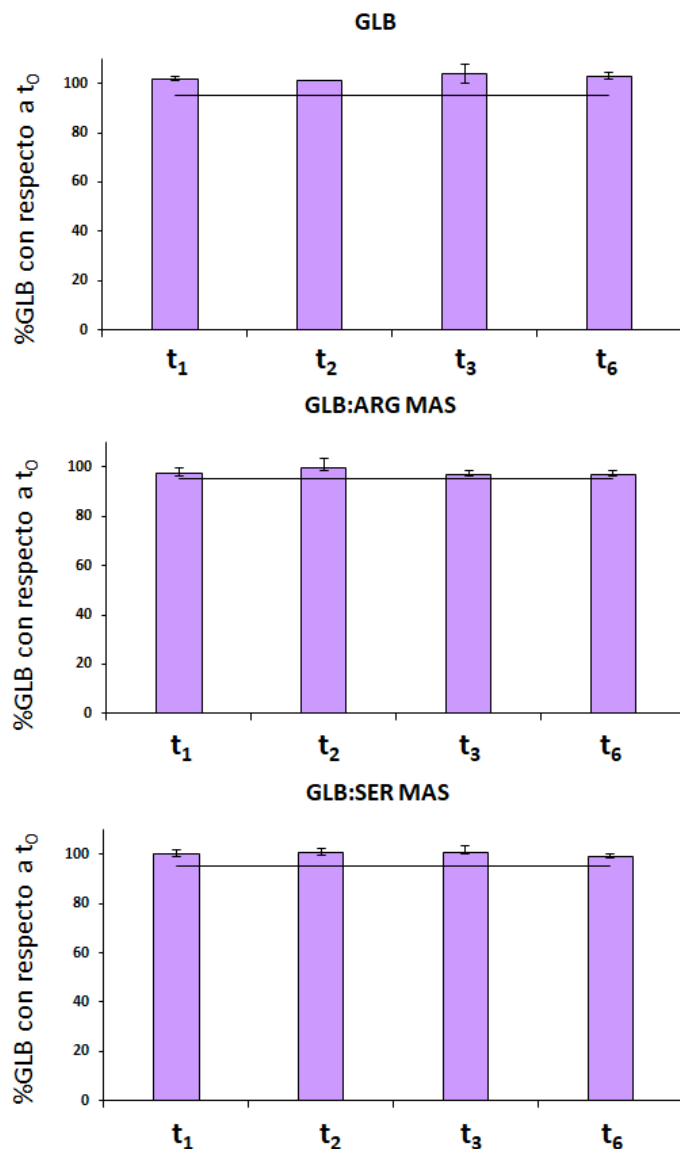


Figura 38. Porcentaje de GLB con respecto a la concentración inicial a t_1 , t_2 , t_3 y t_6 .
La línea horizontal corresponde al 95% de la concentración inicial

La estabilidad física así mismo, también fue mantenida en todos los casos debido a que los difractogramas de las muestras, luego del tiempo de almacenamiento, fueron similares a los patrones exhibidos por el IFA antes del inicio del ensayo de estabilidad (Figura 39).

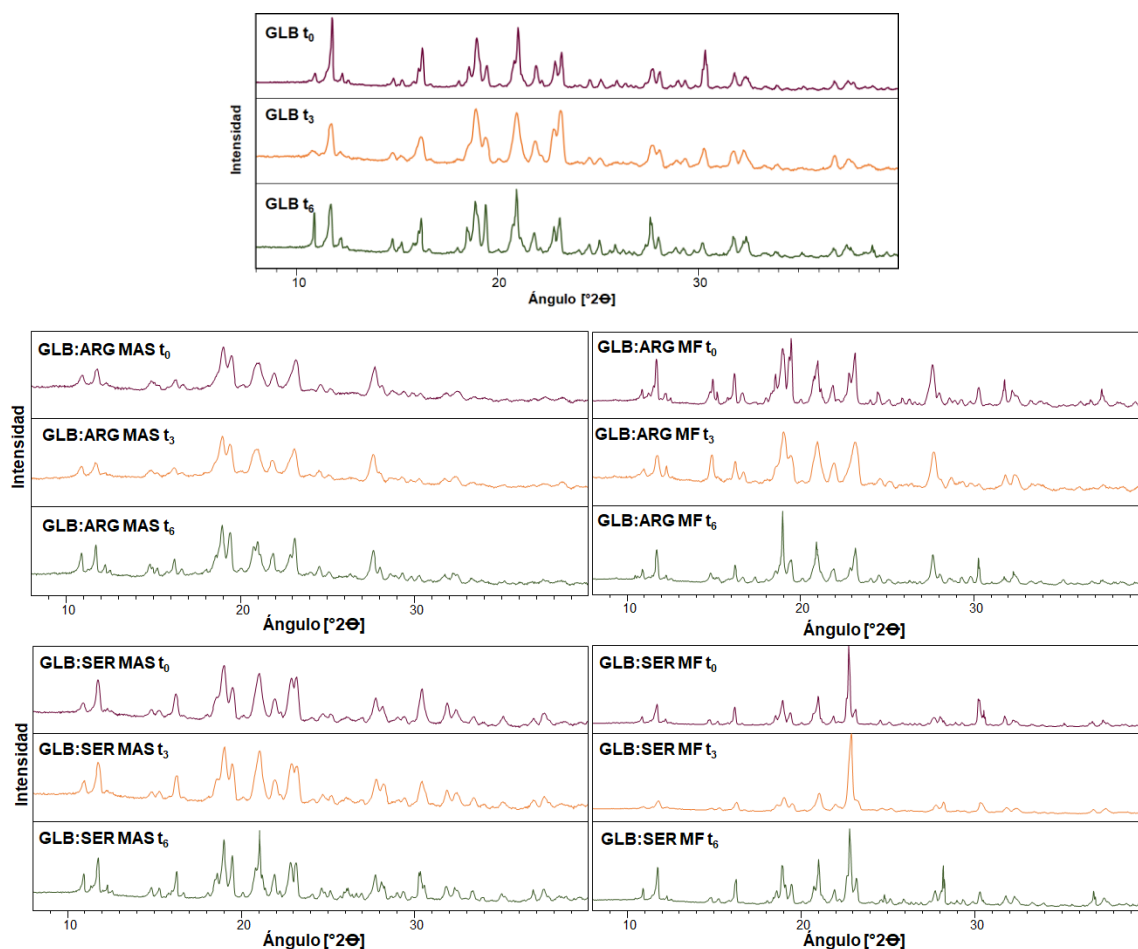


Figura 39. Patrones de difracción de las combinaciones GLB:AA en los diferentes tiempos de estudio t_0 (antes de iniciado el estudio de estabilidad), t_1 (1 mes de iniciado el estudio) y t_6 (a seis meses de iniciado el ensayo)

Por otro lado, el comportamiento térmico de GLB sin procesar, así como de GLB:ARG MAS y GLB:SER MAS, resultaron similares al inicial (Figura 40), probando que al igual que el fármaco puro, las combinaciones sólidas resultaron físicamente estables.

En el caso de GLB, el punto de fusión a t_6 continúa siendo $175,8^{\circ}\text{C}$ tal como se registró a t_0 . Mientras que para GLB:SER MAS tampoco se observó una gran diferencia, ya que a t_0 la fusión fue observada a $171,5^{\circ}\text{C}$ y a t_6 $172,1^{\circ}\text{C}$. Por último, en la combinación GLB:ARG MAS, se observó la deshidratación inicial que ha sido detallada durante la caracterización fisicoquímica así como la fusión que tiene lugar a $158,5^{\circ}\text{C}$ y a t_0 se había registrado a $159,2^{\circ}\text{C}$, por lo que el comportamiento térmico en los casos analizados no ha sufrido modificaciones.

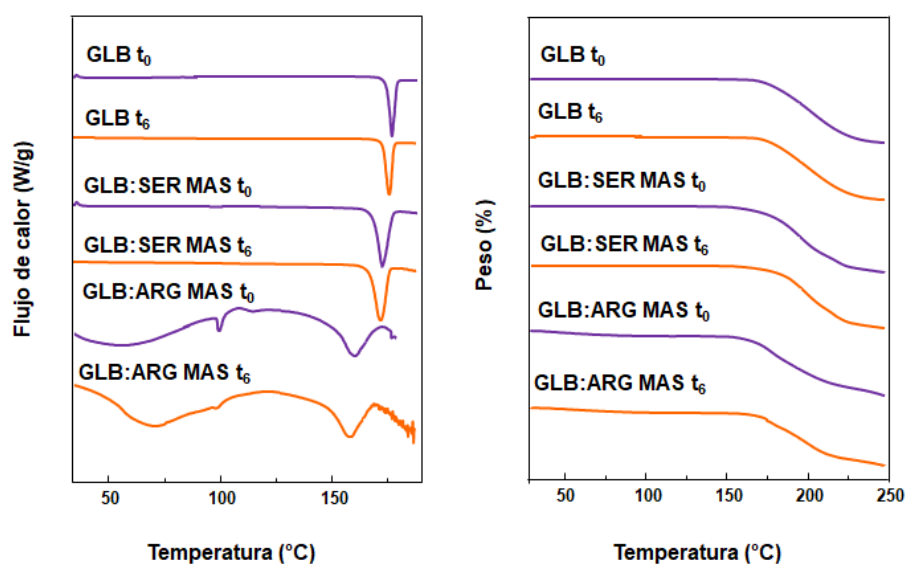


Figura 40. Termogramas de DSC (izquierda) y TG (derecha) de GLB y las combinaciones GLB:AA MAS a t_0 y t_6 .

CONCLUSIONES

Se lograron obtener combinaciones binarias GLB:AA mediante una técnica económica, con mínimo uso de solvente y escasa generación de residuos, lo que satisface los criterios que establece la química verde aplicada a la síntesis y obtención de nuevos sólidos farmacéuticos.

Las combinaciones obtenidas han mejorado el desempeño de disolución del fármaco. En el caso de GLB:SER MAS no se han demostrado interacciones entre los componentes y la mejora en la velocidad de disolución ha sido asociada a la disminución en el tamaño de partícula.

Por otro lado, en el caso de GLB:ARG MAS, mediante análisis térmico se ha podido establecer la existencia de interacciones entre los componentes y a través de DRXP y RMNs se determinó que la fase sólida de la combinación difiere a la de la mezcla física. A su vez, el grado de humectación del sólido se vio mejorado y esto se traduce en un mejorado comportamiento de disolución.

Los ensayos de estabilidad han permitido determinar que la mejora en el perfil de disolución del principio activo, lograda a partir de la combinación con ARG y SER mediante métodos mecanoquímicos, no compromete la estabilidad física y química del fármaco.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES FINALES

CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

A partir de los resultados se puede afirmar que se lograron obtener nuevas formas sólidas de los principios activos propuestos, con propiedades superadoras con respecto a los fármacos actualmente disponibles. Además, se pudieron caracterizar adecuadamente, así como también se evaluaron las propiedades de disolución y en el caso de CLR, se estudió la actividad antimicrobiana y producción de estrés oxidativo de manera exitosa.

Con respecto a CLR, a partir de la combinación con aminoácidos a través de liofilización se pudieron obtener sólidos cristalinos con una morfología particular y con menor tamaño de partícula, características que han permitido mejorar el desempeño de disolución, uno de los objetivos propuestos en el inicio de la investigación. Por otro lado, se demostró que la actividad antimicrobiana no se vio modificada y la formación de especies reactivas de oxígeno se redujo significativamente, ofreciendo así nuevas perspectivas en el uso de este antibiótico.

La combinación CLR:LEU obtenida mediante liofilización ha resultado la más prometedora desde el punto de vista farmacéutico, debido a su mejor desempeño de disolución y a que el aminoácido conserva el grado de cristalinidad luego de ser liofilizado y en el tiempo de estabilidad estudiado, por lo que no atenta contra la estabilidad física del sólido. Un punto importante a destacar es que el principio activo continúa siendo cristalino luego del proceso de obtención del sistema binario, cuando mediante el procedimiento de liofilización se suelen obtener compuestos amorfos, estado que suele revertirse con el tiempo debido a la menor estabilidad termodinámica que presenta.

Por otro lado, en el caso de glibenclamida, fue posible obtener mediante molienda asistida con solvente sistemas sólidos con propiedades de disolución mejoradas. La combinación GLB:ARG MAS resultó ser la de mejor desempeño de disolución, sin verse afectada la estabilidad del fármaco. La mejora, ha sido asociada al incremento en el grado de humectación y a que las partículas obtenidas son más pequeñas que las presentadas por el fármaco sin procesar, también mediante análisis térmico se pudo observar la existencia de interacciones entre los componentes, factores que en diferente medida han contribuido a la mejora en la velocidad de disolución.

Gran parte de las estrategias empleadas en la actualidad dirigidas a mejorar el perfil de disolución de glibenclamida implican la amorfización del sólido. El problema radica en que compuestos de estas características tienden a revertir a la forma cristalina y para estabilizarlos implica un esfuerzo extra. En este caso, el hecho de que se haya mantenido el grado de cristalinidad de GLB es interesante debido a que se logró mejorar el desempeño sin comprometer la estabilidad sólida del compuesto activo.

Un punto importante a destacar en el presente trabajo de tesis, es que se estableció como prioridad la obtención de nuevos sistemas sólidos mediante procesos que respondan a lo establecido por la química verde, es decir, con mínima utilización de compuestos tóxicos o contaminantes y un máximo aprovechamiento de recursos con la menor generación de residuos posibles. Sumado a esto, también debe destacarse el uso de aminoácidos en las combinaciones, debido a que son sustancias que se encuentran en el organismo humano y en la naturaleza, normalmente.

Por otro lado, también es importante mencionar el hecho de haber profundizado la caracterización de los sólidos a nivel particulado, la observación del hábito cristalino no suele ser uno de los principales enfoques durante la caracterización de sólidos farmacéuticos, tal es así que la morfología encontrada en las combinaciones CLR:AA obtenidos por liofilizado (cristales alargados ahuecados en el interior) no ha sido demasiado estudiada en el área farmacéutica y hay pocos compuestos reportados que presentan este hábito cristalino.

Una posibilidad que puede plantearse, a partir de lo establecido con anterioridad, es estudiar con mayor profundidad los parámetros críticos que intervienen en la formación de los cristales con esta característica, debido a que se podría evaluar la posibilidad de obtener partículas de otros fármacos con este hábito cristalino. Resulta interesante además, evaluar la generación de especies reactivas de nitrógeno para complementar el estudio de estrés oxidativo, así como ensayos farmacocinéticos para establecer si la mejora observada en el ensayo *in vitro* también representa una mejora en los niveles plasmáticos logrados de este principio activo.

En el caso de glibenclamida sería interesante evaluar la automatización del proceso de obtención de las combinaciones, dicho desarrollo daría lugar a procesos de obtención de mayor facilidad de escalado. Evaluar la farmacocinética del fármaco a partir de las combinaciones obtenidas es también un camino viable para continuar estudiando el

desempeño de los sistemas sólidos y analizar su potencialidad para ser formulados en un futuro.

MATERIAL COMPLEMENTARIO

ANEXO 1 Asignación de las principales señales de CLR en los espectros de IRTF de las combinaciones CLR:AA

SEÑALES (cm ⁻¹)	CLR	CLR:ARG MF	CLR:ARG LIO	CLR:CIS MF	CLR:CIS LIO	CLR:GLI MF	CLR:GLI LIO	CLR:LEU MF	CLR:LEU LIO
ν O-H	3476	3472	3475	3474	3480	3472	3477	3474	3474
ν O-H	3347	3346	3344	3349	3347	3347	3349	3345	3346
ν N-H	3262	3268	3270	3264	3262	3261	3262	3266	3265
ν C-H Ar	3080	3079	3076	3080	3078	3079	3079	3076	3078
ν C-H ₂	2963	2958	2958	2961	2960	2960	2961	2960	2960
ν C=O	1688	1687	1687	1686	1686	1686	1686	1687	1689
ν N-H	1560	1563	1562	1564	1564	1564	1564	1563	1562
ν N=O ₂	1524	1522	1524	1522	1520	1521	1522	1520	1522

ANEXO 2 Corrimientos químicos de las señales de CLR, AA y sus combinaciones en los espectros de ^{13}C CP-MAS

^{13}C CP-MAS CORRIMIENTOS QUÍMICOS DE CLR, ARG Y SUS COMBINACIONES

^{13}C	CLR	ARG	CLR:ARG MF	CLR:ARG LIO t_0	CLR:ARG LIO t_1
C ₁	66,0		66,0	66,0	66,0
C ₂	165,4		165,4	165,4	165,4
C ₃	54,6		54,6	54,6	54,6
C ₄	66,0		66,0	66,0	66,0
C ₅	76,9		76,9	76,9	76,9
C ₆	146,5		146,5	146,5	146,5
C ₇	122,1-123,1		122,1-123,1	122,1-123,1	122,1-123,1
C ₈	127,2		127,2	127,2	127,2
C ₉	148,1		148,1	148,1	148,1
C ₁₀	127,2		127,2	127,2	127,2
C ₁₁	122,1-123,1		122,1-123,1	122,1-123,1	122,1-123,1
C _{1*}		179,2-180,5 181,9	179,2-180,5 181,9	175,1	175,1
C _{2*}		55,8-53,1	55,8-53,1	56,0	56,0
C _{3*}		31,6-32,4	31,6-32,4	27,6	27,6
C _{4*}		24,3-24,6	24,3-24,6	27,6	27,6
C _{5*}		42,8	42,8	41,5	41,5
C _{6*}		158,5	158,5	157,8	157,8

^{13}C CP-MAS CORRIMIENTOS QUÍMICOS DE CLR, CIS Y SUS COMBINACIONES

^{13}C	CLR	CIS	CLR:CIS MF	CLR:CIS LIO t_0	CLR:CIS LIO t_1
C ₁	66,0		66,0	66,0	66,0
C ₂	165,4		165,4	165,4	165,4
C ₃	54,6		54,6	54,6	54,6
C ₄	66,0		66,0	66,0	66,0
C ₅	76,9		76,9	76,9	76,9
C ₆	146,5		146,5	146,5	146,5
C ₇	122,1-123,1		122,1-123,1	122,1-123,1	122,1-123,1
C ₈	127,2		127,2	127,2	127,2
C ₉	148,1		148,1	148,1	148,1
C ₁₀	127,2		127,2	127,2	127,2
C ₁₁	122,1-123,1		122,1-123,1	122,1-123,1	122,1-123,1
C _{1*}		171,8-173,5	171,8-173,5	171,1-175,5	171,1-175,5
C _{2*}		56,2-56,5	56,2-56,5	57,2	57,2
C _{3*}		23,6-28,4	23,6-28,4	24,8-26,0 27,3-29,6	24,8-26,0 27,3-29,6

¹³C CP-MAS CORRIMIENTOS QUÍMICOS DE CLR, GLI Y SUS COMBINACIONES

¹³ C	CLR	GLI	CLR:GLI MF	CLR:GLI LIO _{T0}	CLR:GLI LIO _{T1}
C ₁	66,0		66,0	66,0	66,0
C ₂	165,4		165,4	165,4	165,4
C ₃	54,6		54,6	54,6	54,6
C ₄	66,0		66,0	66,0	66,0
C ₅	76,9		76,9	76,9	76,9
C ₆	146,5		146,5	146,5	146,5
C ₇	122,1-123,1		122,1-123,1	122,1-123,1	122,1-123,1
C ₈	127,2		127,2	127,2	127,2
C ₉	148,1		148,1	148,1	148,1
C ₁₀	127,2		127,2	127,2	127,2
C ₁₁	122,1-123,1		122,1-123,1	122,1-123,1	122,1-123,1
C ₁ *		176,5	176,5	175,4-176,5	175,4-176,5
C ₂ *		43,5-43,9	43,5-43,9	43,5-43,9	43,5-43,9

¹³C CP-MAS CORRIMIENTOS QUÍMICOS DE CLR, LEU Y SUS COMBINACIONES

¹³ C	CLR	LEU	CLR:LEU MF	CLR:LEU LIO _{T0}	CLR:LEU LIO _{T1}
C ₁	66,0		66,0	66,0	66,0
C ₂	165,4		165,4	165,4	165,4
C ₃	54,6		54,6	54,6	54,6
C ₄	66,0		66,0	66,0	66,0
C ₅	76,9		76,9	76,9	76,9
C ₆	146,5		146,5	146,5	146,5
C ₇	122,1-123,1		122,1-123,1	122,1-123,1	122,1-123,1
C ₈	127,2		127,2	127,2	127,2
C ₉	148,1		148,1	148,1	148,1
C ₁₀	127,2		127,2	127,2	127,2
C ₁₁	122,1-123,1		122,1-123,1	122,1-123,1	122,1-123,1
C ₁ *		176,2-177,1	176,2-177,1	176,2-177,1	176,2-177,1
C ₂ *		53,4-54,6	53,4-54,6	53,4-54,6	53,4-54,6
C ₃ *		41,3-43,0	41,3-43,0	41,3-43,0	41,3-43,0
C ₄ *,5*		25,2-25,6	25,2-25,6	25,2-25,6	25,2-25,6

ANEXO 3 Asignación de las principales señales de GLB en los espectros de IRTF de las combinaciones GLB:AA

SEÑALES (cm⁻¹)	GLB	GLB:ARG MF	GLB:ARG MAS	GLB:SER MF	GLB:SER MAS
v NH urea	3367	3368	3368	3368	3369
v NH urea	3315	3314	3314	3316	3315
v CO amida	1714	1714	1715	1716	1715
v CO urea	1618	1614	1618	1618	1618
v NH urea	1523	1524	1524	1524	1526
v SO₂	1340	1340	1342	1343	1343
v SO₂	1157	1158	1159	1159	1158

ANEXO 4 Corrimientos químicos de las señales de GLB, AA y sus combinaciones en los espectros de ^{13}C CP-MAS

^{13}C	GLB	ARG	GLB:ARG MF	GLB:ARG MAS
C ₁	120,0		120,3	120,5
C ₂	157,7		157,6	157,7
C ₃	118,0		118,0	118,0
C ₄	136,3		135,2	135,0
C ₅	122,0		122,7	122,7
C ₆	130,0		130,0	130,0
C ₇	167,2		166,8	166,8
C ₈	41,8		42,0	41,6
C ₉	36,5		36,4	36,3
OMe	55,6		55,7	55,6
C _{1'}	140,0		140,0	140,0
C _{2'}	126,3		126,3	126,2
C _{3'}	126,3		126,3	126,2
C _{4'}	145,5		145,6	145,5
C _{5'}	126,3		126,3	126,2
C _{6'}	126,3		126,3	126,2
C _{7'}	151,0		151,0	150,7
C _{1''}	51,0		50,8	50,7
C _{2''}	33,3		33,0	33,2
C _{3''}	24,0		24,0	24,0
C _{4''}	26,3		26,5	26,1
C _{5''}	26,0		26,1	25,9
C _{6''}	36,0		35,5	35,4
C _{1*}		179,2-180,5 181,9	179,2-180,3 181,9	182,0
C _{2*}		56,0	55,7	55,6
C _{3*}		31,6-32,4	30,9	30,8
C _{4*}		24,3-24,6	24,0	24,0
C _{5*}		42,8	42,2	41,6
C _{6*}		158,5	157,6	157,7

¹³ C	GLB	SER	GLB:SER MF	GLB:SER MAS
C ₁	120,0		120,0	120,3
C ₂	157,7		157,6	158,0
C ₃	118,0		118,0	118,0
C ₄	136,3		135,2	135,9
C ₅	122,0		122,7	122,7
C ₆	130,0		130,0	130,0
C ₇	167,2		167,0	167,0
C ₈	41,8		41,5	41,5
C ₉	36,5		36,4	36,3
OMe	55,6		55,7	55,6
C _{1'}	140,0		140,0	140,0
C _{2'}	126,3		126,4	126,2
C _{3'}	126,3		126,4	126,2
C _{4'}	145,5		145,4	145,6
C _{5'}	126,3		126,4	126,2
C _{6'}	126,3		126,4	126,2
C _{7'}	151,0		151,2	151,0
C _{1''}	51,0		50,7	50,8
C _{2''}	33,3		33,0	33,3
C _{3''}	24,0		23,7	23,7
C _{4''}	26,3		26,4	26,1
C _{5''}	26,0		26,1	25,9
C _{6''}	36,0		36,2	35,5
C ₁ *		175,2	175,1	175,2
C ₂ *		63,0	63,0	63,0
C ₃ *		55,6	55,8	55,8

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Camarasa, J., Faura, C.C., Iglesias-Osma, M.C. & del Pozo, E. Aportaciones de los medicamentos a la salud y calidad de vida de los pacientes (I). *Actual. en Farmacol. y Ter.* 9 (3), 198–205 (2011).
2. Alsasua, A., Blanco, E., D'Ocon, P., Faura, C.C., Iglesias-Osma, M.C., de Ceballos, M.L. & Tejerina, M. T. Aportaciones de los medicamentos a la salud y calidad de vida de los pacientes (II). *Actual. en Farmacol. y Ter.* 9 (4), 279–290 (2011).
3. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Farmacopea Argentina. Séptima Edición (Buenos Aires, Argentina, 2013).
4. Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W. & Gilman, A.G. Goodman & Gilman: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Novena Edición (Mc. Graw-Hill Interamericana. New York, EE.UU., 1996).
5. Allen, L. V. Jr., Popovich, N. G. & Ansel, H. C. Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. Ninth edition (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, EE.UU., 2011).
6. Williams, H.D., Trevaskis, N.L., Charman, S.A., Shanker, R.M., Charman, W.N., Pouton, C.W., & Porter, C.J.H. Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development. *Pharmacological Reviews* 65, 315–499 (2013).
7. Shekunov, B. Y., Chattopadhyay, P., Tong, H. H. Y. & Chow, A. H. L. Particle size analysis in pharmaceuticals: Principles, methods and applications. *Pharm. Res.* 24, 203–227 (2007).
8. Han, X., Ghoroi, C., To, D., Chen, Y. & Davé, R. Simultaneous micronization and surface modification for improvement of flow and dissolution of drug particles. *Int. J. Pharm.* 415, 185–195 (2011).
9. Serajuddin, A. T. M. Salt formation to improve drug solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 603–616 (2007).
10. Elder, D. P., Holm, R. & De Diego, H. L. Use of pharmaceutical salts and cocrystals to address the issue of poor solubility. *Int. J. Pharm.* 453, 88–100 (2013).
11. Jambhekar, S. S. & Breen, P. J. Drug dissolution: significance of physicochemical properties and physiological conditions. *Drug Discov. Today.* 18, 1173–1184 (2013).
12. Jansook, P., Ogawa, N. & Loftsson, T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* 535, 272–284 (2018).
13. Jog, R. & Burgess, D. J. Pharmaceutical Amorphous Nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 106, 39–65 (2017).

14. Poovi, G. & Damodharan, N. Lipid nanoparticles: A challenging approach for oral delivery of BCS Class-II drugs. *Futur. J. Pharm. Sci.* 4, 191-205 (2018).
15. Datta, S. & Grant, D. J. W. Crystal structures of drugs: Advances in determination, prediction and engineering. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 42–57 (2004).
16. Thakuria, R. & Thakur, T. S. Crystal Polymorphism in Pharmaceutical Science. *Comprehensive Supramolecular Chemistry II.* 5, 283-309 (2017).
17. Korotkova, E. I. & Kratochvíl, B. Pharmaceutical Cocrystals. *Procedia Chem.* 10, 473–476 (2014).
18. Rodrigues, M., Baptista, B., Lopes, J. A. & Sarraguça, M. C. Pharmaceutical cocrystallization techniques. Advances and challenges. *Int. J. Pharm.* 547, 404–420 (2018).
19. Van Den Mooter, G. The use of amorphous solid dispersions: A formulation strategy to overcome poor solubility and dissolution rate. *Drug Discov. Today Technol.* 9, e79–e85 (2012).
20. Vasconcelos, T., Marques, S., das Neves, J. & Sarmiento, B. Amorphous solid dispersions: Rational selection of a manufacturing process. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 100, 85–101 (2016).
21. Shi, Q., Moinuddin, S. M. & Cai, T. Advances in Coamorphous Drug Delivery Systems. *Acta Pharm. Sin. B.* 9, 19-35 (2018).
22. Newman, A., Reutzel-Edens, S. M. & Zografi, G. Coamorphous Active Pharmaceutical Ingredient–Small Molecule Mixtures: Considerations in the Choice of Coformers for Enhancing Dissolution and Oral Bioavailability. *J. Pharm. Sci.* 107, 5–17 (2018).
23. Halebian, J. K. Characterization of Habits and Crystalline Modification of Solids and Their Pharmaceutical Applications. *J. Pharm. Sci.* 64, 1269–1288 (1975).
24. Tiwary, A.K & Jindal, M. Crystal Habit Changes and Dosage Form Performance in *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.* 1, 1–18 (Informa Healthcare USA, Inc, 2012).
25. Garekani, H. A., Sadeghi F., Badiiee A., Mostafa A. & Rajabi-Siahboomi A.R. Crystal habit modifications of ibuprofen and their physicochemical characteristics. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27, 803–809 (2001).
26. Ho, R., Wilson, D. A. & Heng, J. Y. Y. Crystal habits and the variation in surface energy heterogeneity. *Cryst. Growth Des.* 9, 4907–4911 (2009).
27. Bhargavi, N., Chavan, R. B. & Shastri, N. R. Generation of Hollow Crystals of a Drug with Lamellar Structure Forming Ability. *Cryst. Growth Des.* 17, 1480–1483 (2017).
28. Dunn, P.J., Wells A.S. & Williams, M. T. *Green chemistry in the pharmaceutical industry.* Second edition. (WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, Germany, 2010).

29. Pajaro Castro, N.P. & Olivero Verbel, J.T. Química verde : Un nuevo reto. Cienc. E Ing. Neogranadina 21, 169–182 (2011).
30. Tilborg, A., Norberg, B. & Wouters, J. Pharmaceutical salts and cocrystals involving amino acids: A brief structural overview of the state-of-art. Eur. J. Med. Chem. 74, 411–426 (2014).
31. Löbmann, K., Grohgan, H., Laitinen, R., Strachan, C. & Rades, T. Amino acids as co-amorphous stabilizers for poorly water soluble drugs - Part 1: Preparation, stability and dissolution enhancement. Eur. J. Pharm. Biopharm. 85, 873–881 (2013).
32. Mura, P., Bettinetti, G.P., Cirri, M., Maestrelli, F., Sorrenti, M. & Catenacci L. Solid-state characterization and dissolution properties of Naproxen-Arginine-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin ternary system. Eur. J. Pharm. Biopharm. 59, 99–106 (2005).
33. Aaltonen, J., Alleso, M., Mirza, S., Koradia, V., Gordon, K.C. & Rantanen, J. Solid form screening - A review. Eur. J. Pharm. Biopharm. 71, 23–37 (2009).
34. Maheshwari, R., Chourasiya, Y., Bandopadhyay, S., Katiyar, P.K., Sharma, P., Deb P.K. & Tekade R.K. Levels of Solid State Properties: Role of Different Levels During Pharmaceutical Product Development. in *Dosage Form Design Parameters*. 1–30 (Elsevier Inc., 2018).
35. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. National Library of Medicine, Bethesda, USA. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5959> (acceso febrero 2019).
36. Rehder, S., Sakmann, A., Rades, T. & Leopold, C. S. Thermal degradation of amorphous glibenclamide. Eur. J. Pharm. Biopharm. 80, 203–208 (2012).
37. World Health Organization. Antimicrobial resistance. Global report on surveillance. (WHO Library Cataloguing in Publication Data Antimicrobial, Ginebra, Suiza, 2014).
38. Falagas, M. E., Grammatikos, A. P. & Michalopoulos, A. Potential of old-generation antibiotics to address current need for new antibiotics. Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 6, 593–600 (2008).
39. Páez, P. L., Becerra, M. C. & Albasa, I. Chloramphenicol-induced oxidative stress in human neutrophils. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 103, 349–353 (2008).
40. Ingebrigtsen, S. G., Didriksen, A., Johannessen, M., Škalko-Basnet, N. & Holsæter, A. M. Old drug, new wrapping – A possible comeback for chloramphenicol? Int. J. Pharm. 526, 538–546 (2017).
41. Mahmoud, S. S., Gehmam, J. D., Azzopardi, K., Robins-Browne, R. M. & Separovic, F. Liposomal phospholipid preparations of chloramphenicol for ophthalmic applications. J. Pharm. Sci. 97, 2691–2701 (2008).

42. Stratton, C. W. Editor in Chief. Chloramphenicol. Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter of Vanderbilt University School of Medicine. 18, 89–91 (2002).
43. Vasconcelos, T., Sarmiento, B. & Costa, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discov. Today* 12, 1068–1075 (2007).
44. Li, Z., Lin, X., Yu, L., Li, X., Geng, F. & Zheng, L. Effects of chloramphenicol on the characterization of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. *J. Dispers. Sci. Technol.* 30, 1008–1014 (2009).
45. Fernandes, R. F., Cantaruti Júnior, A.A.B., Porto, A.B., Ferreira, G.R., Flores, L.S., Corrêa, C.C., Dos Santos, H.F., de Oliveira, L.F.C. & Machado F.C. Vibrational spectroscopic and supramolecular studies applied to a chloramphenicol derivative. *Vib. Spectrosc.* 88, 63–70 (2017).
46. Knapik-Kowalczyk, J., Wojnarowska, Z., Chmiel, K., Rams-Baron, M., Tajber, L. & Paluch, M. Can Storage Time Improve the Physical Stability of Amorphous Pharmaceuticals with Tautomerization Ability Exposed to Compression? The Case of a Chloramphenicol Drug. *Mol. Pharm.* 15, 1928–1940 (2018).
47. Bernstein, J. Polymorphism in Molecular Crystals. First edition (Clarendon Press, Oxford University Press Inc., New York, EE.UU., 2002).
48. Berk, Z. Freeze Drying (Lyophilization) and Freeze Concentration. Chapter 23 in *Food Process Engineering and Technology*. 567–581 (Elsevier, 2013).
49. Burra, M., Jukanti, R., Janga, K.Y., Sunkavalli, S., Velpula, A., Ampati S. & Jayaveera K.N. Enhanced intestinal absorption and bioavailability of raloxifene hydrochloride via lyophilized solid lipid nanoparticles. *Adv. Powder Technol.* 24, 393–402 (2013).
50. Fonte, P., Reis, S. & Sarmiento, B. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. *J. Control. Release* 225, 75–86 (2016).
51. Gonçalves Carvalho, S., Ataíde Siqueira, L., Santos Zanini, M., dos Santos Matos, A.P., Holandino Quaresma, C., Mota da Silva, L., Faloni de Andrade S., Aparecida Severi, J. & Oliveira Villanova, J.C. Physicochemical and in vitro biological evaluations of furazolidone-based β -cyclodextrin complexes in *Leishmania amazonensis*. *Res. Vet. Sci.* 119, 143–153 (2018).
52. Szabó, Z. I., Deme, R., Mucsi, Z., Rusu, A., Mare, A.D., Fiser, B., Toma, F., Sipos, E. & Tóth, G. Equilibrium, structural and antibacterial characterization of moxifloxacin- β -cyclodextrin complex. *J. Mol. Struct.* 1166, 228–236 (2018).
53. Aiassa, V., Zoppi, A., Albesa, I. & Longhi, M. R. Inclusion complexes of chloramphenicol with β -cyclodextrin and aminoacids as a way to increase drug solubility and modulate ROS production. *Carbohydr. Polym.* 121, 320–327 (2015).

54. Ahmed, E. A., Omar, H. M., elghaffar, S. K. A., Ragb, S. M. M. & Nasser, A. Y. The antioxidant activity of Vitamin C, DPPD and L-cysteine against Cisplatin-induced testicular oxidative damage in rats. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1115–1121 (2011).
55. Piste, P. Cysteine-master antioxidant. *Int. J. Pharm. , Chem. Biol. Sci.* 3, 143–149 (2013).
56. Wu, G. Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 37, 1–17 (2009).
57. Liang, M., Wang, Z., Li, H., Cai, L., Pan, J., He, H., Wu, Q., Tang, Y., Ma, J. & Yang, L. L-Arginine induces antioxidant response to prevent oxidative stress via stimulation of glutathione synthesis and activation of Nrf2 pathway. *Food Chem. Toxicol.* 115, 315–328 (2018).
58. Bronte, V. & Zanovello, P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 641–654 (2005).
59. Jin, H. J., Lee, J.H., Kim, D.H., Kim, K.T., Lee, G.W., Choi, S.J., Chang, P.S & Paik, H.D. Antioxidative and nitric oxide scavenging activity of branched-chain amino acids. *Food Sci. Biotechnol.* 24, 1555–1558 (2015).
60. Hu, J., Nie, Y., Chen, S., Xie, C., Fan, Q., Wang, Z., Long, B., Yan, G., Zhong, Q. & Yan, X. Leucine reduces reactive oxygen species levels via an energy metabolism switch by activation of the mTOR-HIF-1 α pathway in porcine intestinal epithelial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 89, 42–56 (2017).
61. Do Vale Morais, A. R., Alencar, E.d.N., Xavier Júnior, F.H., de Oliveira, C.M., Rodrigues Marcelino. H., Barratt, G., Fessi, H., Tabosa do Egito, E.S. & Elaissari, A. Freeze-drying of emulsified systems: A review. *Int. J. Pharm.* 503, 102–114 (2016).
62. Volonté, M. G. & Quiroga, P. *Análisis farmacéutico*. (Editorial de la Universidad de La Plata, La Plata, Argentina, 2013).
63. Storey, R.A. & Ymén, I. Editors. *Solid State Characterization of Pharmaceuticals*. First Edition (Wiley, Chichester, Inglaterra, 2011).
64. Florence, A. T. & Attwood, D. *Physicochemical Principles of Pharmacy*. Fourth Edition (Pharmaceutical Press, Londres, Inglaterra, 2006).
65. Sajan, D., Sockalingum G.D., Manfait, M., Joe, I.H., & Jayakumar V.S. NIR-FT Raman, FT-IR and surface-enhanced Raman scattering spectra, with theoretical simulations on chloramphenicol. *J. Raman Spectrosc.* 39, 1772–1783 (2008).
66. Kumar, S. & Rai, S. B. Spectroscopic studies of L-arginine molecule. *Indian J. Pure Appl. Phys.* 48, 251–255 (2010).
67. Bramhane, D. M., Saindane, N. S. & Vavia, P. R. Inclusion complexation of weakly acidic NSAID with β -cyclodextrin: Selection of arginine, an amino acid, as a novel ternary component. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 69, 453–460 (2011).

68. Parker, S. F. Assignment of the vibrational spectrum of l-cysteine. *Chem. Phys.* 424, 75–79 (2013).
69. Kumar, S., Rai, A. K., Singh, V. B. & Rai, S. B. Vibrational spectrum of glycine molecule. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 61, 2741–2746 (2005).
70. Kumar, S. Vibrational Spectroscopy Spectroscopic studies of valine and leucine molecules a comparative study. *Elixir Vib. Spec.* 39, 4996–4999 (2011).
71. Louër, D. Powder X-Ray Diffraction, Applications. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. Third Edition. 723–731. (Elsevier, 2017).
72. Kalita, S., Devi, B., Kandimalla R., Sharma, K.K., Sharma, A., Kalita, K., Kataki, A.C. & Kotoky, J. Chloramphenicol encapsulated in poly-ε-caprolactone–pluronic composite: nanoparticles for treatment of MRSA-infected burn wounds. 2971–2984 (2015).
73. Maghsoodi, M. & Kiafar, F. Co-precipitation with PVP and Agar to Improve Physicomechanical Properties of Ibuprofen. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 16, 627–634 (2013).
74. Braga, D. & Grepioni, F. Editors. *Making Crystals by Design. Methods, Techniques and Applications*. (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2007).
75. Campbell, S. N., Williams, A. C., Grimsey, I. M. & Booth, S. W. Quantitative analysis of mannitol polymorphs . X-ray powder diffractometry — exploring preferred orientation effects. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28, 1149–1159 (2002).
76. Eric Scholar. Chloramphenicol. University of Nebraska Medical Center, Omaha, USA. 1-7 (Elsevier, 2007)
77. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. National Library of Medicine, Bethesda, USA. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5862> (acceso febrero 2019).
78. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. National Library of Medicine, Bethesda, USA. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/750> (acceso febrero 2019).
79. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. National Library of Medicine, Bethesda, USA. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6106> (acceso febrero 2019).
80. Karde, V. & Ghoroi, C. Influence of surface modification on wettability and surface energy characteristics of pharmaceutical excipient powders. *Int. J. Pharm.* 475, 351–363 (2014).
81. Meor Mohd Affandi, M.M.R., Tripathy, M. & Majeed, A.B.A. Solubility enhancement of simvastatin and atorvastatin by arginine: Contact angle determination, wettability and surface energy characteristics. *J. Mol. Liq.* 240, 340-344 (2017).
82. Jiang, M., Zhou, B. & Wang, X. Comparisons and validations of contact angle models. *Int.*

- J. Hydrogen Energy 43, 6364–6378 (2018).
83. Hebbar, R. S., Isloor, A. M. & Ismail, A. F. Contact Angle Measurements. Chapter 12 en Membrane Characterization. 219-255 (Elsevier, 2017).
 84. Alghunaim, A., Kirdponpattara, S. & Newby, B. M. Z. Techniques for determining contact angle and wettability of powders. Powder Technol. 287, 201–215 (2016).
 85. Romero, M. R., Wolfel, A., Alvarez Igarzabal, C. I. Smart valve: Polymer actuator to moisture soil control. Sensors Actuators, B Chem. 234, 53–62 (2016).
 86. Maeda, K. & Natsu, W. Study on effect of ECM conditions on wettability of machined surface. Procedia CIRP 42, 107–111 (2016).
 87. Stalder Aurélien, “Biomedical Imaging Group-Drop Analysis”, École Polytechnique Fédérale de Lausanne (2013). Disponible en <http://bigwww.epfl.ch/demo/dropanalysis/> (acceso febrero 2019)
 88. Raczowska, J., Ohar, M., Stetsyshyn, Y., Zemłaa, J., Awsiuk, K., Rysz, J., Fornal, K., Bernasik, A., Ohar, H., Fedorova, S., Shtapenko, O., Polovkovych, S., Novikov, V. & Budkowski, A. Temperature-responsive peptide-mimetic coating based on poly(N-methacryloyl-L-leucine): Properties, protein adsorption and cell growth. Colloids Surfaces B Biointerfaces. 118, 270-279 (2014).
 89. Mayeen, A., Shaji, L.K., Nair, A.K. & Kalarikkal N. Morphological Characterization of Nanomaterials. Chapter 12 in Characterization of Nanomaterials. 335–363 (Elsevier, 2018).
 90. Ipohorski, M. & Bozzano, P. B. Microscopía electrónica de barrido en la caracterización de materiales. Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias. Cienc. Invest. 63, 43–53 (2013).
 91. Modi, S. R., Dantuluri, A.K.R, Puri, V., Pawar, Y.B., Nandekar, P., Sangamwar, A.T., Perumalla, S.R., Sun, C.C. & Bansal, A.K. Impact of crystal habit on biopharmaceutical performance of celecoxib. *Cryst. Growth Des.* 13, 2824–2832 (2013).
 92. Fong, S. Y. K., Ibisogly, A. & Bauer-Brandl, A. Solubility enhancement of BCS Class II drug by solid phospholipid dispersions: Spray drying versus freeze-drying. Int. J. Pharm. 496, 382–391 (2015).
 93. Khanfar, M., Al-Taani, B., Alsmadi, M. & Zayed, A. Enhancement of the dissolution and bioavailability from freeze-dried powder of a hypocholesterolemic drug in the presence of Soluplus. Powder Technol. 329, 25–32 (2018).
 94. Pindelska, E., Sokal, A. & Kolodziejski, W. Pharmaceutical cocrystals, salts and polymorphs: Advanced characterization techniques. Adv. Drug Deliv. Rev. 117, 111–146 (2017).

95. Tishmack, P. A., Bugay, D. E. & Byrn, S. R. Solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy-pharmaceutical applications. *J. Pharm. Sci.* 92, 441–474 (2003).
96. Chen, Y., Wang, J. & Flanagan, D. R. Fundamental of diffusion and dissolution. *Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice: Second Edition.* 253-270 (Elsevier, 2016).
97. Gray, V. A. *Pharmaceutical Analysis: Dissolution Testing in Encyclopedia of Analytical Science.* Third edition. 1-6 (Elsevier, 2018).
98. Zhang, G. G. Z., Law, D., Schmitt, E. A. & Qiu, Y. Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 371–390 (2004).
99. U.S. Department of Health and Human Services. FDA. Guidance for Industry. Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. 1–22 (FDA, Rockville, EE.UU., 1997).
100. United States Pharmacopeial Convention. *The United States Pharmacopeia, USP 34-NF 29.* (United States Pharmacopeial Convention, Rockville, EE.UU, 2010)
101. Balouiri, M., Sadiki, M. & Ibensouda, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* 6, 71–79 (2016).
102. Jorgensen, J. H. & Ferraro, M. J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin. Infect. Dis.* 49, 1749–1755 (2009).
103. Schumacher, A., Vranken, T., Malhotra, A., Arts, J. J. C. & Habibovic, P. In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 37, 187–208 (2018).
104. Kuper, K. M., Boles, D. M., Mohr, J. F. & Wanger, A. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Primer for Clinicians. *Pharmacotherapy* 29, 1326–1343 (2009).
105. Zuorro, A., Fidaleo, M. & Lavecchia, R. Solubility enhancement and antibacterial activity of chloramphenicol included in modified β -cyclodextrins. *Bull. Korean Chem. Soc.* 31, 3460–3462 (2010).
106. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1–40 (2006).
107. Finkel, T. & Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247 (2000).
108. Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S. & Kalayci, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO J.* 5, 9–19 (2012).
109. Samimi, A., Kalantari, H., Lorestani, M. Z., Shirzad, R. & Saki, N. Oxidative stress in normal hematopoietic stem cells and leukemia. *Apmis* 126, 284–294 (2018).

110. Holt, D. E. & Bajoria, R. The role of nitro-reduction and nitric oxide in the toxicity of chloramphenicol. *Hum. Exp. Toxicol.* 18, 111–118 (1999).
111. Eraso, A. J. & Albesa, I. Eriobotrya japonica counteracts reactive oxygen species and nitric oxide stimulated by chloramphenicol. *Am. J. Chin. Med.* 35, 875–885 (2007).
112. Huynh-Ba, K. Editor. Handbook of stability testing in pharmaceutical development: Regulations, methodologies, and best practices. (Springer, Nueva York, EE.UU., 2009).
113. Maggio, R. M., Vignaduzzo, S. E. & Kaufman, T. S. Practical and regulatory considerations for stability-indicating methods for the assay of bulk drugs and drug formulations. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 49, 57–70 (2013).
114. Prabhakar, P. K., Kumar, A. & Doble, M. Combination therapy: A new strategy to manage diabetes and its complications. *Phytomedicine* 21, 123–130 (2014).
115. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. Seventh Edition (IDF, Bruselas, Bélgica, 2015).
116. Wright, J. J. & Tylee, T. S. Pharmacologic Therapy of Type 2 Diabetes. *Med. Clin. North Am.* 100, 647–663 (2016).
117. Gonçalves, L. M. D., Mestrelli, F., Di Cesare Mannelli, L., Ghelardini, C., Almeida, A.J. & Mura, P. Development of solid lipid nanoparticles as carriers for improving oral bioavailability of glibenclamide. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 102, 41–50 (2016).
118. Lucio, D., Irache, J. M., Font, M. & Martínez-Ohárriz, M. C. Supramolecular structure of glibenclamide and β -cyclodextrins complexes. *Int. J. Pharm.* 530, 377–386 (2017).
119. Elbahwy, I. A., Ibrahim, H. M., Ismael, H. R. & Kasem, A. A. Enhancing bioavailability and controlling the release of glibenclamide from optimized solid lipid nanoparticles. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 38, 78–89 (2017).
120. Zerrouk, N., Corti, G., Ancillotti, S., Maestrelli, F., Cirri, M. & Mura, P. Influence of cyclodextrins and chitosan, separately or in combination, on glyburide solubility and permeability. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 62, 241–246 (2006).
121. Chauhan, B., Shimpi, S. & Paradkar, A. Preparation and evaluation of glibenclamide-polyglycolized glycerides solid dispersions with silicon dioxide by spray drying technique. *Eur. J. Pharm. Sci.* 26, 219–230 (2005).
122. Tan, D., Loots, L. & Friščić, T. Towards medicinal mechanochemistry: Evolution of milling from pharmaceutical solid form screening to the synthesis of active pharmaceutical ingredients (APIs). *Chem. Commun.* 52, 7760–7781 (2016).
123. Friščić, T., Childs, S. L., Rizvi, S. A. A. & Jones, W. The role of solvent in mechanochemical and sonochemical cocrystal formation: a solubility-based approach for predicting cocrystallisation outcome. *CrystEngComm* 11, 418–426 (2009).

124. Hasa, D. & Jones, W. Screening for new pharmaceutical solid forms using mechanochemistry: A practical guide. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 117, 147–161 (2017).
125. Piatti, P., Monti, L.D., Valsecchi, G., Magni, F., Setola, E., Marchesi, F., Galli-Kienle, M., Pozza, G. & Alberti K.G.M.M. Long-Term Oral L-Arginine Administration Improves Peripheral and Hepatic Insulin Sensitivity in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care* 24, 875–880 (2001).
126. Kamei, N., Khafagy, E. S., Hirose, J. & Takeda-Morishita, M. Potential of single cationic amino acid molecule “Arginine” for stimulating oral absorption of insulin. *Int. J. Pharm.* 521, 176–183 (2017).
127. Hambrock, A., Löffler-Walz, C. & Quast, U. Glibenclamide binding to sulphonylurea receptor subtypes: Dependence on adenine nucleotides. *Br. J. Pharmacol.* 136, 995–1004 (2002).
128. Laitinen, R., Löbmann, K., Grohgan, H., Strachan, C. & Rades, T. Amino acids as Co-amorphous excipients for simvastatin and glibenclamide: Physical properties and stability. *Mol. Pharm.* 11, 2381–2389 (2014).
129. Jarmelo, S., Reva, I., Carey, P. R. & Fausto, R. Infrared and Raman spectroscopic characterization of the hydrogen-bonding network in L-serine crystal. *Vib. Spectrosc.* 43, 395–404 (2007).
130. Barth, A. The infrared absorption of amino acid side chains. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 74, 141–173 (2000).
131. Sanz, D., Claramunt, R. M., Alkorta, I., Sánchez-Sanz, G. & Elguero, J. The structure of glibenclamide in the solid state. *Magn. Reson. Chem.* 50, 246–255 (2012).
132. Neacșu, A., Gheorghe, D., Contineanu, I., Tanasescu, S. & Perişanu, S. A thermochemical study of serine stereoisomers. *Thermochim. Acta* 595, 1–5 (2014).
133. Rasenack, N. & Mu, B. W. Micron-Size Drug Particles : Common and Novel Micronization Techniques. *Pharm. Dev. Technol.* 9, 1–13 (2004).
134. Nichols, G., Byard, S., Bloxham, M.J., Botterill, J., Dawson, A., Dennis, A., Diart, V., North, N.C. & Sherwood, J.D. A Review of the Terms Agglomerate and Aggregate with a Recommendation for Nomenclature Used in Powder and Particle Characterization. *J. Pharm. Sci.* 91, 2103–2109
135. Guilbaud, J.B., Baker, H., Clark, B.C., Meehan, E. & Khimyak, Y.Z. Effect of Encapsulating Arginine Containing Molecules on PLGA: A Solid-State NMR Study. *J. Pharm. Sci.* 99, 2697–2710 (2010).
136. Shah, S. R., Parikh, R. H., Chavda, J. R. & Sheth, N. R. Application of Plackett-Burman screening design for preparing glibenclamide nanoparticles for dissolution enhancement.

- Powder Technol. 235, 405–411 (2013).
137. Yamamoto, K., Nakano, M., Arita, T. & Nakai, Y. Dissolution Rate and Bioavailability of Griseofulvin from a Ground Mixture with Microcrystalline Cellulose. J. Pharmacokinet. Biopharm. 2, 487–493 (1974).

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN PUBLICADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA PRESENTE

TESIS DOCTORAL

"PREPARATION OF CHLORAMPHENICOL/AMINO ACID COMBINATIONS EXHIBITING ENHANCED DISSOLUTION RATES AND REDUCED DRUG-INDUCED OXIDATIVE STRESS". Vanesa B. Sterren, Virginia Aiassa, Claudia Garnero, Yamila Garro Linck, Ana K. Chattah, Gustavo A. Monti, Marcela R. Longhi, Ariana Zoppi, AAPS PharmSciTech (2017); 18, 2910-2918.

TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN PRESENTADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA

PRESENTE TESIS DOCTORAL

"EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE SISTEMAS SÓLIDOS GLIBENCLAMIDA: AMINOÁCIDO". Sterren V, Zoppi A, Abraham Miranda J, Longhi M. 5ª Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa), La Punta, San Luis, Noviembre 2018.

"PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF GLIBENCLAMIDE SERINE COMBINATION". Sterren V, Zoppi A, Abraham Miranda J, Longhi M. 4ª Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa), Rosario, Santa Fe, Octubre 2016.

"SISTEMA SUPRAMOLECULAR GLIBENCLAMIDA:ARGININA. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y BIOFARMACÉUTICAS". Sterren V, Zoppi A, Abraham Miranda J, Longhi M. VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas (COIFFA), Córdoba, Noviembre 2015.

"ACTIVIDAD MICROBIOLÓGICA, EFECTO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE COMBINACIONES CLORANFENICOL:AMINOÁCIDO". Sterren V, Aiassa V, Garro Linck Y, Chattah A, Monti G, Longhi M, Zoppi A. VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas (COIFFA), Córdoba, Noviembre 2015.

“PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF COAMORPHOUS GLIBENCLAMIDE SYSTEM”. Sterren V, Zoppi A, Abraham Miranda J, Longhi MR. 3ª Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa), Córdoba, Septiembre 2014.

“DEVELOPMENT OF CHLORAMPHENICOL SUPRAMOLECULAR SYSTEMS TO IMPROVE DISSOLUTION RATES”. Ciochetto G, Sterren V, Longhi MR, Zoppi A. 3ª Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa), Córdoba, Septiembre 2014.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por otorgarme una vida llena de oportunidades.

A mi directora, Dra. Marcela Longhi, por invitarme a formar parte de su grupo, por creer en mí antes que yo misma lo hiciera. Por apoyarme en el desarrollo de mi vida académica y personal.

A la comisión de tesis, Dra. Elba Buján, Dr. Raúl Carbonio y Dra. Ariana Zoppi, por la buena predisposición, por estar presentes en todas las reuniones de resultados y sus devoluciones enriquecedoras.

Al Dr. Rubén Maggio, por aceptar evaluar este trabajo y por sus devoluciones.

A la Facultad de Ciencias Químicas, dónde he pasado 10 años de mi vida como estudiante de grado y posgrado, por brindarme la posibilidad de desarrollarme profesionalmente y desempeñar actividades docentes en diversos ámbitos, pude descubrir gracias a esto una de mis grandes pasiones.

A toda la gente que formó y forma parte del departamento de Ciencias Farmacéuticas, docentes y no docentes (en este grupo incluyo a los untefos) porque con el simple saludo en el pasillo ya hacían la diferencia, por todo lo compartido, docencia, reuniones, actividades de extensión, cursos, almuerzos, congresos, brindis para celebrar todos nuestros días.

A mis compañeras de docencia en estos años: Ne, Sole, Caro, Julia, Juli y Diame, por hacer que las tareas sean más gratas en su compañía; y a mis compañeros del ciclo de nivelación, en los que encontré a un grupo suficientemente friki donde pude sentirme acompañada en mis ñoñeces.

A mis alumnos, los que han pasado en estos cinco años por las clases de análisis farmacéutico y a los chicos del ciclo de nivelación también, porque créanme que he aprendido mucho más a su lado que encerrada en el laboratorio, me han enseñado que no existe la verdad absoluta, que no está mal equivocarse y que siempre es bueno reconocer los propios errores, y lo más importante, me enseñaron que es posible divertirse en el trabajo.

A la gente que formó y forma parte de los laboratorios 202 (Fredy, Sergio, Esteban, Juampi), 205 (Cristina, Sole, Jime, Noel, Pau, Cin) y 116 (Gladys, Julia, Ne, Romi, Nadi), por las charlas, consejos y numerosos festejos bajo el lema de que siempre hay una

buena razón para compartir una comida. Una mención especial para Sole, Jime y Esteban por su ayuda con el HPLC.

Al Longhi's team: Dra. Lonyi cariñosamente hablando (por sus esfuerzos en vano para convertirme en una persona más relajada), Ari (por haberme invitado a hacer las prácticas en el 2012, porque sin aquel mail hoy no estaría aquí, por invitarme a tus clases de análisis en el 2013 y por acompañarme siempre), Clau (gracias por ser la voz de la razón, alguien tiene que controlar las locuras de este equipo), Vicky (por tu colaboración experimental y por el apoyo logístico y psicológico), Caro (por tus consejos sobre cómo ser una Marie Kondo en el trabajo y en la vida, perdón por el episodio de La Bella y La Bestia, lo lamentaré por siempre), Agus (por compartir conmigo pasiones como la docencia, los gatos, las picadas), Anto (por tu dulzura -en todo sentido- y por estar siempre al pie del cañón), Sole (gracias por compartir memes y música conmigo), Mica (por tu espontaneidad, siempre es bueno tener una potterhead cerca para practicar tus hechizos), Moni (gracias por la motivación, los consejos y los palitos de la selva) y Juli (por todo lo compartido en lo académico y personal, fue un placer haber transitado gran parte de esta etapa junto a vos, gracias amiga).

A Manu García por abrirme las puertas de su laboratorio y su buena predisposición para enseñarme a usar el equipo de medición del ángulo de contacto.

A la gente de los juegos deportivos del CONICET, por los viajes, los encuentros y la camaradería.

A Flor (por tantos momentos compartidos, desde cursos hasta la odisea del barco en Puerto Pirámides, gracias amiga), Meli (fue un placer trabajar con una amiga, gracias por tantas risas y meriendas) y al resto del laboratorio 210 por su buena predisposición cada vez que necesité algo.

A mis grandes adquisiciones del doctorado, Cinthia, la persona con el corazón más grande que conozco, siempre tiene para mí un abrazo, un chocolate, una palabra de aliento y a Romi, que está dejando brillitos a su paso desde que la conozco, mi compañera de tesis desde el principio, siempre dispuesta a escuchar y mandar audios a mansalva, gracias por compartir esta etapa conmigo amiga, hiciste que todo sea más fácil.

A mi familia, a mi gran familia, todos ellos, primos ruidosos, tías cocineras, tíos regaleros, abuelos eternos. En especial, a mis papás, principales auspiciantes de mi vida

y mi vida académica. Gracias por apoyarme en cada nueva iniciativa, por dejarme volar pero por recordarme la importancia de nunca olvidar de dónde vengo, por los valores que traigo desde pequeña, por enseñarme a respetar la vida, el trabajo, a ponerme siempre en el lugar del otro y entender que cada uno está peleando su propia batalla y que siempre hay que ser amable.

A mi hermana Arlén, que está dibujando corderitos para mi desde 1996, si bien puede ser una verdadera pesadilla de a ratos, es mi contención, siempre tiene la palabra precisa y no tiene miedo de decir la verdad nunca, quién se banca a mi lado las salidas a los museos y ferias del libro, convivir con vos en esta etapa de mi vida ha sido una odisea y un placer.

¿Cómo no agradecer a mi querido Ambrosetti! Si soy lo que soy gracias al lugar del que vengo y al que siempre regreso, a sus calles, al campo, a la plaza llena de flores, a las escuelas y todos los que formaron parte de estas instituciones durante mi paso por ellas...que han logrado que a aquella pequeña niña se le llenara la cabeza de pajaritos.

Al taller de dibujo, donde aprendí que hay química en el arte y arte en la química, donde rompí con muchas de mis estructuras, aprendí a mirar cada vez que veo y encontré un maravilloso grupo humano, contención, un hombro amigo, un oído atento y las risas no faltaron.

A mis amigas de la vida, Analía y María José, que a pesar del tiempo y la distancia seguimos igual de cercanas como el primer día, cuando estoy con ustedes siento que el tiempo no ha pasado aunque nuestras reuniones incluyan té con chocolates.

A Flori, con quién compartí gran parte de mi carrera de grado, miles de charlas farmacéuticas y filosóficas, por los bailes de Shakira y las misas de los Capuchinos. ¡Gracias Amiga!.

Para finalizar, un fragmento de El Libro de los Abrazos de Eduardo Galeano:

"Un hombre del pueblo de Neguá, en la costa de Colombia, pudo subir al alto cielo.

A la vuelta contó. Dijo que había contemplado desde arriba, la vida humana.

Y dijo que somos un mar de fueguitos.

-El mundo es eso -reveló- un montón de gente, un mar de fueguitos.

Cada persona brilla con luz propia entre todas las demás.

No hay dos fuegos iguales. Hay fuegos grandes y fuegos chicos y fuegos de todos los colores. Hay gente de fuego sereno, que ni se entera del viento, y gente de fuego loco que llena el aire de chispas. Algunos fuegos, fuegos bobos, no alumbran ni queman; pero otros arden la vida con tanta pasión que no se puede mirarlos sin parpadear, y quien se acerca se enciende".

Gracias a todos por iluminar, cada uno a su manera, mi camino.